

УДК 577.12

## КАНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ РОДОПСИНОВ МОЖЕТ БЫТЬ ВЫЯВЛЕНА ПРИ ИЗМЕРЕНИИ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМОСТИ ФОТОТОКОВ НА ПЛОСКИХ БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ

© 2021 Т.И. Рокицкая<sup>1\*</sup>, Н. Маляр<sup>2</sup>, К.В. Ковалев<sup>2,3</sup>, А.А. Волков<sup>4,5</sup>,  
В.И. Горделий<sup>2,3,4,5</sup>, Ю.Н. Антоненко<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), 141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

<sup>3</sup> Университет Гренобль–Альпы, СЕА, CNRS, Институт структурной биологии (IBS), 38044 Гренобль, Франция

<sup>4</sup> Юлихский исследовательский центр, Институт биологической обработки информации. Структурная биохимия (IBI-7), 52425 Юлих, Германия

<sup>5</sup> Юлихский исследовательский центр, Центр структурной биологии Юлиха (JuStruct), 52425 Юлих, Германия

Поступила в редакцию 04.12.2020

После доработки 22.01.2021

Принята к публикации 22.01.2021

Определение функциональных свойств ретиналь-содержащих белков зачастую включает исследования на модельных системах, например, измерения электрического тока через плоские бислойные липидные мембраны (БЛМ) с адсорбированными на одной поверхности мембраны протеолипосомами. Однако возможности этого метода до конца не изучены. На примере двух светочувствительных белков – бактериородопсина (bR) и канального родопсина 2 (ChR2) – мы показали, что потенциал-зависимости стационарных фототоков в присутствии протоннофора имеют сильно отличающиеся характеристики. В случае протонной помпы bR регистрируемый через БЛМ фототок не меняет направление при изменении знака прикладываемых напряжений, а для светочувствительного белка канального типа ChR2 характерны увеличение фототока с ростом напряжения и смена знака тока при переходе через нулевые значения напряжения. В работе также показано, что для регистрации максимальных стационарных фототоков лучше всего подходит протоннофор 4,5,6,7-тетрахлоро-2-трифлуорометил бензимидазол (ТТФБ). При использовании карбонилцианид-*m*-хлорофенилгидразона (ХКФ) измеряемые фототоки для bR значительно меньше по амплитуде, а для ChR2 – практически равны нулю. Это различие между ТТФБ и ХКФ, по-видимому, связано с тем, что ХКФ, в отличие от ТТФБ, обладает большей скоростью переноса протонов через липосомальные мембраны, чем через декан-содержащие БЛМ, которые используются в качестве поверхности адсорбции протеолипосом.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ретиналь-содержащие белки, канальный родопсин, протонная помпа, протеолипосомы, бислойная липидная мембрана, протоннофор.

DOI: 10.31857/S0320972521040035

### ВВЕДЕНИЕ

Бурный рост числа исследований микробных родопсинов, начавшийся с определения основных функциональных свойств бактериородопсина (bR) [1], привел к значительному развитию и возникновению новых методов изучения светочувствительных мембранных белков.

Бактериородопсин, как в природных пурпурных мембранах, так и солюбилизированный в мицеллах детергента и встроенный в протеолипосомы (ПЛ) [2, 3], оказался чрезвычайно важным и удобным объектом исследования, что привело к его всестороннему изучению в модельных мембранных системах, в том числе при адсорбции протеолипосом на плоских бислойных ли-

Принятые сокращения: БЛМ – бислойная липидная мембрана; ТТФБ – 4,5,6,7-тетрахлоро-2-трифлуорометил бензимидазол; ФКФ – карбонилцианид *n*-трифторометоксифенилгидразон; ХКФ – карбонилцианид-*m*-хлорофенилгидразон; bR – бактериородопсин; ChR2 – канальный родопсин 2; ПЛ – протеолипосомы; ФХ – фосфатидилхолин;  $E_p$  – эквивалентное напряжение помпы,  $R_m$  – эквивалентное сопротивление БЛМ,  $R_c$  – эквивалентное сопротивление области контактов с липосомами,  $R_{ch}$  – эквивалентное сопротивление канала,  $R_v$  – эквивалентное сопротивление липосомальной мембраны;  $R_p$  – эквивалентное сопротивление помпы.

\* Адресат для корреспонденции.

пидных мембранах (БЛМ) [4, 5]. В настоящее время метод адсорбции протеолипосом на мембранных фильтрах, пропитанных липидом, применяется для измерения электрических потенциалов, генерируемых белком при обычном или лазерном освещении [6]. Также при адсорбции ПЛ или мембранных дисков со светочувствительными белками на БЛМ проводятся измерения переходных токов [7, 8] в ответ на включение и выключение освещения или стационарных фототоков через БЛМ в присутствии протонифоров или других переносчиков [9–11]. Способ измерения светочувствительного тока с помощью адсорбции ПЛ или фрагментов пурпурных мембран на поверхности БЛМ получил широкое применение благодаря тому, что он оказался наиболее чувствительным. В этом случае амплитуда стационарного тока в присутствии протонифоров и/или ионообменников была гораздо выше, чем при встраивании bR непосредственно в БЛМ путём добавления в мембран-формирующий раствор или путём формирования БЛМ из двух монослоев липида с светочувствительным белком [8, 10].

Открытие родопсинов канального типа [12, 13], осуществляющих пассивный транспорт ионов при воздействии светом, привело к революции в нейробиологии и развитию оптогенетики [14]. Катионный канальный родопсин 2 (ChR2) из одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* был первым микробным родопсином, использованным для деполяризации нейрональной мембраны [15]. Впоследствии набор оптогенетических инструментов расширился за счёт разнообразных модификаций ChR2 [16] и открытия других природных катионных и анионных канальных родопсинов [17, 18], в том числе катионного канального родопсина из гигантских вирусов [19]. Помимо канальных родопсинов, некоторые светочувствительные ионные помпы также эффективны в качестве оптогенетических инструментов: для светоиндуцированного торможения нейрональной активности путём гиперполяризации плазматической мембраны нейрона используются хлорная помпа *NpHR* из *Natronomonas pharaonic* [20], протонная помпа археродопсин 3 (Arch) из *Halorubrum sodomense* [21], натриевая помпа KR2 и её модификации [22–25], а для деполяризации мембраны можно применять обратную протонную помпу [26]. К сожалению, по причине низкой экспрессии в плазматической мембране эукариотических клеток бактериородопсин не нашел широкого применения в оптогенетике [20]. В последнее время активно проводятся эксперименты по рациональному дизайну оптогенетических инстру-

ментов на основе перечисленных родопсинов для получения белков с новыми свойствами, например, с необычными параметрами открывания/закрывания канала, селективности и проводимости. Кроме того, продолжается поиск генов родопсинов в геномах неизученных бактерий, грибов, вирусов и дальнейшая гетерологическая экспрессия наиболее интересных из кодируемых ими родопсинов с целью определения их функциональности, эффективности и возможностей дальнейшего применения [27–29].

В большинстве работ новые или мутантные белки экспрессируются в плазматической мембране эукариотических клеток, и их фотоэлектрическая активность изучается методом фиксации потенциала всей клетки [17, 26]. Однако многие белки, особенно прокариотического происхождения, слабо экспрессируются в плазматической мембране эукариот. Кроме этого, в опытах на клетках затруднительно значительно изменять ионный состав внеклеточной среды (такие параметры, как pH и ионная сила) из-за необходимости поддерживать осмотическое давление и концентрации ионов в физиологических диапазонах значений, что может ограничивать изучение свойств белков. В этой связи измерения в модельных системах с ПЛ, в том числе сорбированными на поверхности БЛМ, могут более полно раскрыть функциональные свойства родопсинов. Впервые стационарные фототоки через БЛМ в присутствии протонифора для ChR2 были продемонстрированы в работе Feldbauer et al. [30]. В представленной работе мы сравнили зависимости светочувствительного тока через БЛМ с адсорбированными ПЛ от прикладываемого к БЛМ напряжения и его знака в присутствии протонифора для протонной помпы bR и канального родопсина 2. В случае канальной функции белка (на примере ChR2) величины фототоков меняют свой знак при напряжениях близких к нулю, в то же время фототоки протонной помпы bR всегда положительны. Такие различия очень похожи на результаты, получаемые при электрофизиологических измерениях на клетках [18, 31]. Также нам удалось выяснить, что не любой протонифор применим для изучения светочувствительных белков с канальными свойствами. В опубликованных ранее работах наибольшее применение нашёл протонифор 1799, однако он коммерчески недоступен. Мы показали, что из-за более эффективного увеличения проводимости липосомальной мембраны, чем плоской БЛМ, такой широко распространенный протонифор, как карбонилцианид-*m*-хлорофенилгидразон (ХКФ), не может применяться в данной модельной системе. Из нескольких протестированных

известных протонофоров 4,5,6,7-тетрахлоро-2-трифлуорометил бензимидазол (ТТФБ) оказался самым подходящим кандидатом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали реагенты фирмы «Sigma-Aldrich», США (если не указано другое). 4,5,6,7-тетрахлоро-2-трифлуорометил бензимидазол был предоставлен Ягужинским Л.С. (НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ).

**Плоская бислойная липидная мембрана** формировалась из раствора в декане, который содержал 2% (w/v) дифитаноилфосфатидилхолина (дифитаноил-ФХ) и 0,04% (w/v) димиристоил-этил-ФХ («Avanti Polar Lipids», США), на отверстия в перегородке, разделяющей на два отсека тефлоновую ячейку, содержащую буферный раствор [32]. 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). При измерении проводимости БЛМ, индуцированной протонофорами ТТФБ и ХКФ, мембрана формировалась из 2%-ного раствора смеси фосфолипидов из соевых бобов (азолектин) в сквалене.

Электрический ток регистрировался в условиях фиксации потенциала. Разность потенциалов подавалась на хлорсеребряные электроды, помещенные через агаровые мосты в тефлоновую 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 WinWCP Strathclyde Electrophysiology Software, написанной Дж. Демпстером (University of Strathclyde, 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 (*цис*) стороны, ПЛ добавляли к БЛМ с противоположной (*транс*) стороны. В некоторых экспериментах использовали синий светофильтр СЗС-9 с шириной пропускания 400–540 нм и коэффициентом поглощения 0,36 на длине волны 480 нм.

**Протеоллипосомы с родопсином (ChR2 или bR).** В стеклянной колбе готовили 1%-ный (w/v) раствор азолектина из соевых бобов в хлороформе («Химмед», Россия). От хлороформа избавлялись с помощью роторного испарителя и ва-

куумного насоса. Полученную тонкую липидную пленку, образовавшуюся на стенках колбы ресуспендировали в растворе, содержащем 0,1 М NaCl («Applichem», Германия), 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. Получившуюся смесь перемешивали на орбитальной мешалке 2 ч при минимальном освещении, а затем сменяли частицы (так проводили минимум 4 смены частиц). ChR2 был экспрессирован в *Leishmania tarentolae*, выделен и очищен, как описано в работе Volkov et al. [33]. bR был солюбилизован из пурпурных мембран по ранее опубликованному протоколу [34].

**Измерение транспорта протонов через мембрану липосом.** Проницаемость бислойных фосфолипидных мембран для ионов водорода оценивали с помощью ранее предложенной и несколько модифицированной методики [35]. Для приготовления нагруженных пиранином липосом смесь липидов (5,3 мг пальмитоил-олеоил ФХ, 1,3 мг пальмитоил-олеоил фосфатидил-глицерола и 3,3 мг холестерина) растворили в хлороформе, а затем высушили в струе азота в пробирке с круглым дном. После этого липиды были ресуспендированы в 1 мл буферного раствора (20 mM Mes, 20 mM Tris-HCl, 20 mM Трицин, 100 mM KCl, pH 6,0), содержащего 0,5 mM pH-чувствительного флуоресцентного красителя пиранин. Суспензию тщательно встряхивали, затем трижды замораживали/оттаивали. Моноламелярные липосомы получали путем экструзии через поликарбонатный фильтр с порами диаметром 0,1 мкм с помощью экструдера («Avanti Polar Lipids»). Наружный пиранин убирали хроматографией на колонке с гелем Sephadex G-50 («Sigma-Aldrich»), уравновешенной буферным раствором 20 mM Mes, 20 mM Tris-HCl, 20 mM Трицин, 100 mM KCl, pH 6,0. В ходе эксперимента липосомы разбавляли в этом буфере с pH 6,0, в начале эксперимента pH внутри и снаружи липосом был одинаков. Далее к липосомам добавляли требуемую концентрацию протонофора и инкубировали в течение 1 мин. Протонный транспорт инициировался одномоментным увеличением pH водного раствора до значения 8,0 при добавлении определенного количества раствора щелочи, КОН. Измерение скорости увеличения pH внутри липосом проводили в присутствии 1 mM ксилен-пиридиinium бромида для тушения флуоресценции вытекающего пиранина. Внутрелипосомальный pH оценивали по измерению

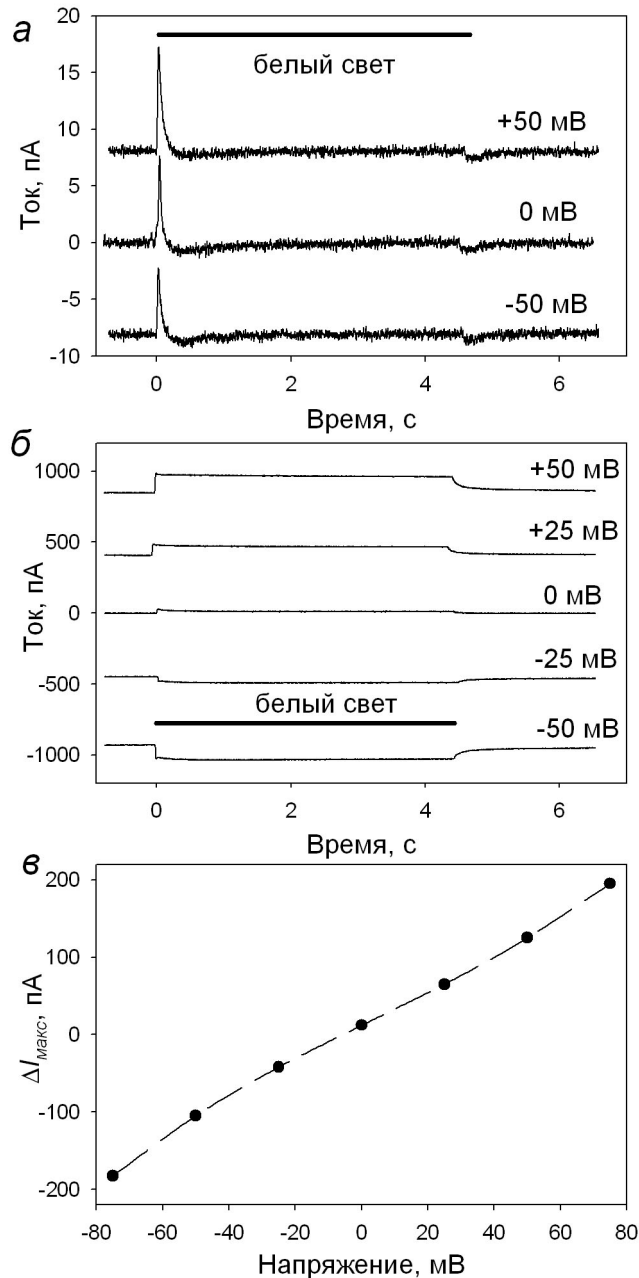
флуоресценции при длине волны 505 нм, длина волны возбуждения — 455 нм. Измерения проводили на спектрофлуориметре Панорама Флюорат-02 («Люмэкс», Россия). В конце каждого

эксперимента добавляли ласалоцид А в концентрации 1 мкМ для полного выравнивания рН внутри и снаружи липосом. Для предотвращения образования разности потенциалов на липосомальной мембране эксперименты проводили в присутствии 10 нМ валиномицина. Для уменьшения спонтанного выравнивания рН температуру поддерживали на уровне 15 °С.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Измерения светоиндуцированного тока через БЛМ с адсорбированными протеолипосомами со встроенным ChR2. Добавление 10–15 мкл ПЛ со встроенным ChR2 с одной стороны БЛМ (*транс*-сторона с высокоомным входом усилителя) приводило к постепенному увеличению переходного тока в ответ на включение освещения белым светом (рис. 1, а) или синим светом (с использованием фильтра СЗС-9, данные не приведены). Процесс инкубации липосом длился приблизительно 1 ч или более, пока амплитуда переходного тока не прекращала увеличиваться. Амплитуда переходного тока никогда не превышала 10–15 пА, время спада тока отличалось от эксперимента к эксперименту в диапазоне 40–130 мс. Регистрация тока при разных напряжениях обычно показывала небольшое увеличение стационарной темновой проводимости БЛМ после прилипания ПЛ, после включения освещения стационарная проводимость БЛМ не менялась (рис. 1, а).

Ранее было показано, что ПЛ со встроенным бактериородопсином при адсорбции налипают на поверхность бислоистой липидной мембраны, но не сливаются с ней и остаются интактными на поверхности БЛМ [7, 8]. В наших экспериментах при адсорбции ПЛ, содержащих ChR2 или bR, практически отсутствует светоиндуцированный стационарный ток через БЛМ, а регистрируется только переходный ток в ответ на включение и выключение света. Это связано с тем, что БЛМ не проводит ионы, которые транспортирует bR, или которые проникают через ChR2 под действием приложенного напряжения. В начале освещения происходит увеличение поверхностного заряда на мембране благодаря переносу ионов через липидную мембрану липосом, в результате этого процесса наблюдается переходный ток через БЛМ, подобный ёмкостному ответу на прикладывание напряжения. В наших экспериментах, также как и у других авторов, не происходит слияния ПЛ с плоской мембраной, так как в течение длительного времени налипания липосом не наблюдается увеличение стационарной проводимости БЛМ в



**Рис. 1.** Измерение электрического тока через БЛМ с адсорбированными ПЛ с ChR2. а — Записи тока через БЛМ при напряжениях 0,  $\pm$ 50 мВ через 1 ч после начала инкубации с протеолипосомами. Период освещения показан сплошной черной линией. б — Записи тока через БЛМ с адсорбированными протеолипосомами в присутствии 0,1 мкМ ТТФБ при различных напряжениях. в — Зависимость максимального фототока ( $\Delta I_{\text{макс}}$ ) от напряжения. Буферный раствор содержал 10 мМ Мес, 10 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, pH 6,0

процессе освещения при различных напряжениях, а регистрируется только переходный ток на включение освещения (рис. 1, а, кривые +/-50 мВ). Если бы происходило слияние ПЛ с БЛМ, мы бы наблюдали светоиндуцированное увеличение проводимости мембраны в случае ПЛ с ChR2.

Далее в эксперименте, представленном на рис. 1, а, с *цис*-стороны мембраны добавляли 0,1 мкМ протонофора ТТФБ, который значительно увеличивал проводимость БЛМ (до 10 нСм и более). Величина стационарного тока через БЛМ при разных напряжениях показана на рис. 1, б до начала освещения ( $t = 0$  с). При освещении БЛМ в присутствии ТТФБ ток через мембрану увеличивался (рис. 1, б) на величину фототока  $\Delta I(t)$ . При прикладывании к липидной мембране напряжения разной величины и полярности включение света приводило к увеличению абсолютной величины стационарного тока (рис. 1, б). Зависимость максимального изменения тока ( $\Delta I_{\max}$ ), вызванного освещением, от приложенной разности потенциалов к электродам ( $V$ ) является почти линейной и пересекает ось ординат при  $V \approx -6$  мВ (рис. 1, в). Мы связываем отличие от линейной зависимости  $\Delta I_{\max}$  от  $V$  с тем, что проводимость БЛМ, опосредованная ТТФБ, нелинейно зависит от приложенного потенциала. В то же время вольт-амперная характеристика ChR2 в клеточной мембране тоже нелинейна и определяется свойствами самого белка [36], что может также сказываться на измерениях на БЛМ. Мы оценили относительное изменение тока  $\alpha$  при освещении для противоположных значений напряжений:

$$\alpha = \frac{|\Delta I_V| + |\Delta I_{-V}|}{|I_V| + |I_{-V}|},$$

и величина  $\alpha$  оказалась равна 12,5% для +/-25 мВ, 12,9% – для +/-50 мВ и 13,1% – для +/-75 мВ. Относительное изменение тока при освещении варьирует от эксперимента к эксперименту, но в каждом отдельном опыте  $\alpha$  почти не зависит от прикладываемого напряжения.

Следует отметить, что в присутствии ТТФБ во всех опытах с ПЛ с ChR2 при  $V = 0$  мВ при освещении регистрировался небольшой положительный стационарный ток (рис. 1, б). Направление тока совпадает с таковым для бактериородопсина (результаты представлены ниже), что находится в согласии с представлением о слабой помповой активности ChR2 [30]. Появление стационарного тока через БЛМ с адсорбированными протеолипосомами с ChR2 в ответ на освещение синим светом было показано ранее в

присутствии протонофора 1799 при  $V = 0$  мВ [30] в условиях, когда единственным проникающим через белок катионом является протон. В то же время внутримолекулярный перенос протона с шиффова основания на акцептор не был подтвержден у ChR2 из *C. reinhardtii* при освещении вспышкой лазера, хотя был обнаружен у нескольких родопсинов с канальными свойствами из других водорослей [37].

При освещении БЛМ синим светом качественно вид потенциал-зависимости светоиндуцированного тока от приложенного напряжения не изменился (рис. 2). В присутствии ТТФБ величины  $\Delta I_{\max}$  были примерно на 40% меньше по сравнению с тем же экспериментом, но при освещении белым светом без синего фильтра. Также увеличилось время нарастания фототока до максимального стационарного значения при включении освещения (рис. 2, а). Увеличение рН водного раствора с двух сторон мембраны (с помощью небольшого оттитрованного количества КОН) привело к уменьшению проводимости мембраны и значительному уменьшению  $\Delta I$  (рис. 2, б–г). Однако относительное изменение тока в ответ на освещение  $\alpha$  изменилось незначительно:  $(8,5 \pm 0,5)\%$  при рН 6,0,  $(7,1 \pm 0,1)\%$  при рН 7,0 и  $(6,7 \pm 0,1)\%$  при рН 8,1 (среднее  $\pm$  среднеквадратичное отклонение при разных приложенных потенциалах). Также с ростом рН наблюдалось существенное ускорение кинетики спада фототока при выключении освещения. Этот результат коррелирует с показанной ранее зависимостью времени спада фототока ионных каналов ChR2 от внутриклеточного рН после вспышки лазера, полученной методом пэтч-кламп-регистрации тока на ооцитах, экспрессирующих ChR2 [13].

**Измерения светоиндуцированного тока через БЛМ с адсорбированными протеолипосомами со встроенным bR.** Для сравнения потенциал-зависимости индуцированного тока канального родопсина с родопсином, который функционирует исключительно как протонная помпа, мы провели эксперименты с ПЛ со встроенной протонной помпой bR. Величина переходного тока после включения белого света (рис. 3, а) была на порядок больше, чем в случае с ChR2, направление тока совпадало с результатами, полученными другими авторами [7, 8]. После добавления протонофора ТТФБ с *цис*-стороны стационарная проводимость БЛМ значительно увеличилась, и появился стационарный светоиндуцированный ток протонной помпы (рис. 3, б). Направление тока указывает на движение протонов через БЛМ под действием света со стороны адсорбции ПЛ (*транс*-сторона) на противоположную сторону. Это говорит о закачивании

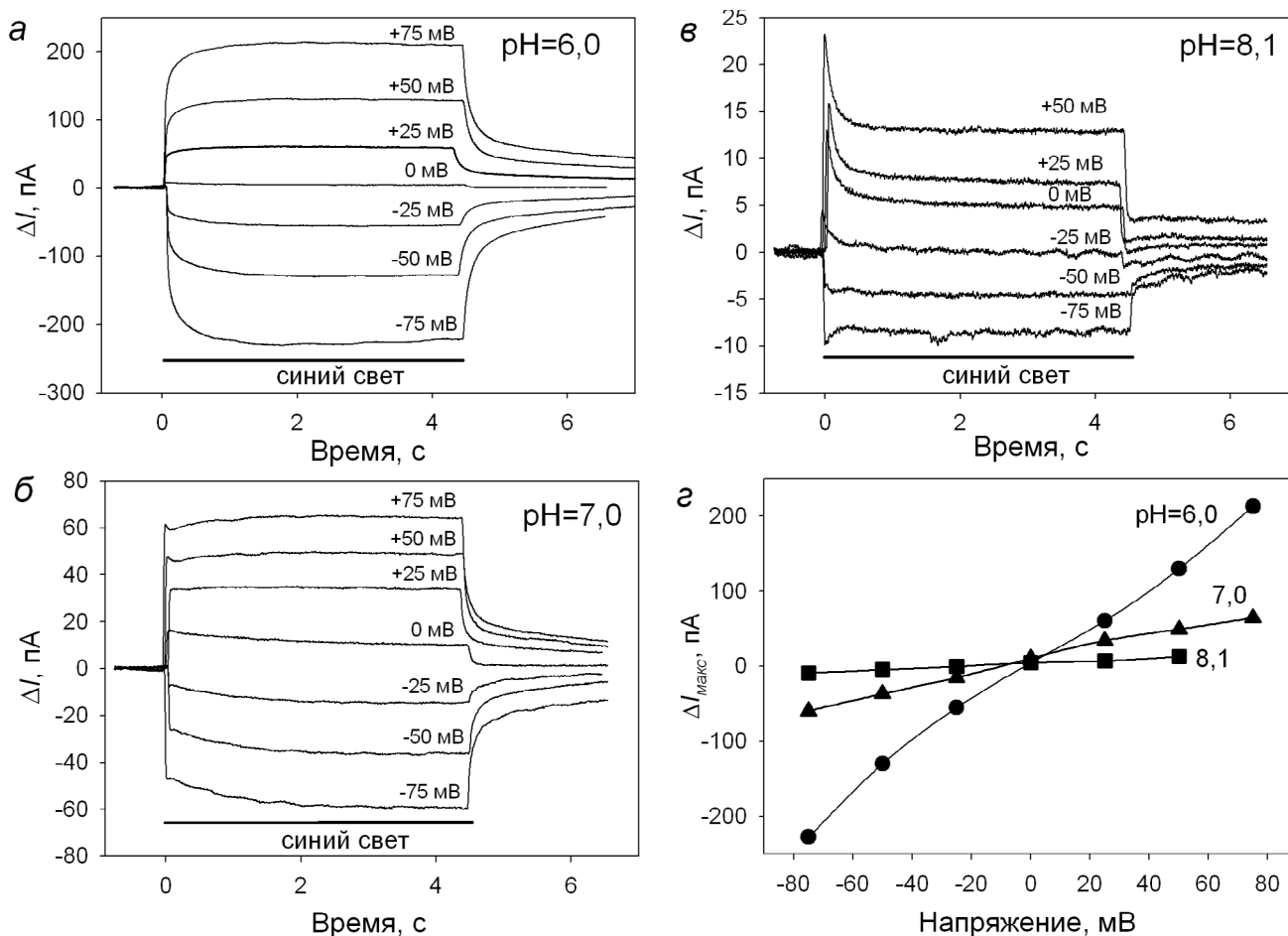


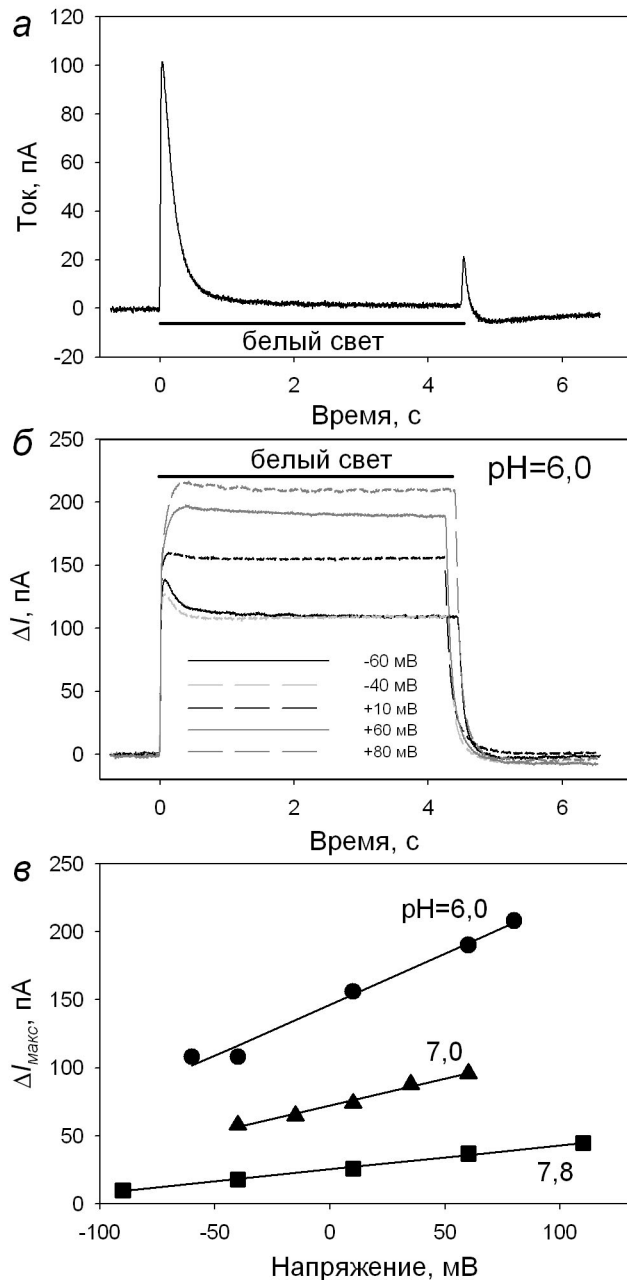
Рис. 2. Кинетики фототока через БЛМ с адсорбированными ПЛ с ChR2 в присутствии 0,1 мкМ ТТФБ при разных напряжениях при освещении светом в присутствии синего фильтра при pH 6,0 (а), 7,0 (б) и 8,1 (в). Период освещения показан сплошной черной линией. г – Зависимость величины максимального стационарного фототока ( $\Delta I_{\text{макс}}$ ) от приложенного напряжения. Буферный раствор содержал 10 мМ Мес, 10 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, pH 6,0

протонов внутрь ПЛ и проникновении их через область контакта липосом с БЛМ на *цис*-сторону благодаря работе протонатора ТТФБ. Защелачивание водных растворов симметрично с двух сторон мембраны до pH 7,0, а pH 7,8 приводило к уменьшению проводимости мембраны, опосредованной протонатором, и уменьшению  $\Delta I$ . Светоиндуцированный ток был при всех значениях pH и приложенных к БЛМ напряжениях положительного знака (рис. 3, в).

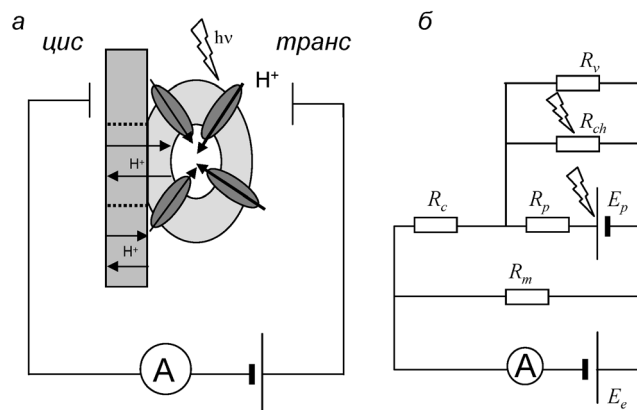
**Эквивалентная электрическая схема БЛМ с адсорбированными протеолипосомами со светочувствительным белком.** Итак, добавление протонатора ТТФБ приводило к значительному увеличению протонной проводимости БЛМ и появлению стационарного фотоиндуцированного тока, который был постоянного знака при любых напряжениях для bR или менял направление согласно полярности напряжения — для ChR2 (рис. 1–3). Чтобы понять, каким обра-

зом регистрируется ток в условиях фиксации напряжения на БЛМ, необходимо рассмотреть схему адсорбции везикул на поверхности мембраны (рис. 4, а) и соответствующую ей эквивалентную электрическую схему (рис. 4, б). Подобные модели для быстрых переходных процессов были тщательно изучены ранее [38–40], и было показано, что время уменьшения переходного тока в ответ на включение света соответствует RC времени мембраны и изменяется в диапазоне 100 мс. Для изучения светоиндуцированных стационарных токов в зависимости от внешнего напряжения мы использовали модель, предложенную в работе Vodyanov et al. [41], в которой авторы пренебрегли ёмкостными переходными процессами. Мы незначительно модифицировали эквивалентную электрическую схему, чтобы модель описывала также возможные каналные свойства родопсинов, и ввели эквивалентное сопротивление канала ( $R_{ch}$ )

(рис. 4, б). Очевидно, что в случае проявления канальных свойств родопсина ток ионной утечки через мембрану ПЛ при освещении будет усиливаться. Поэтому сопротивление  $R_{ch}$  в электрической схеме расположено параллельно



**Рис. 3.** Измерение электрического тока через БЛМ с адсорбированными ПЛ с bR. *а* – Записи тока через БЛМ при напряжении 0 мВ через 1 ч после начала инкубации с протеолипосомами. Период освещения показан сплошной черной линией. *б* – Кинетики фототока через БЛМ с адсорбированными ПЛ в присутствии 0,1 мкМ ТТФБ при разных напряжениях. Буферный раствор содержал 10 мМ Мес, 10 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, pH 6,0. *в* – Зависимость величины максимального фототока от приложенного напряжения при разных pH



**Рис. 4.** *а* – Схематическое изображение плоской БЛМ с адсорбированными ПЛ в условиях фиксации напряжения и в присутствии протонофора. Область контакта ПЛ и БЛМ обозначена пунктиром. *б* – Эквивалентная электрическая схема, где  $E_p$  – эквивалентное напряжение помпы,  $R_m$  – эквивалентное сопротивление БЛМ (за исключением области контактов с липосомами),  $R_c$  – эквивалентное сопротивление области контактов с липосомами,  $R_{ch}$  – эквивалентное сопротивление канала,  $R_v$  – эквивалентное сопротивление липосомальной мембраны и  $R_p$  – эквивалентное сопротивление помпы. Ёмкости мембран в данном приближении не рассматриваются

с  $E_p$ , то есть с генератором тока. Анализ этой схемы дает соотношение между током и приложенным напряжением  $E_e$  в виде:

$$I = \frac{E_e}{R_m} + \frac{E_e \cdot R_p + (E_p + E_e) \cdot R_v \cdot R_{ch} / (R_v + R_{ch})}{R_c \cdot R_p + (R_c + R_p) \cdot R_v \cdot R_{ch} / (R_v + R_{ch})}, \quad (1)$$

где  $E_p$  – эквивалентное напряжение помпы,  $R_m$  – эквивалентное сопротивление БЛМ (за исключением области контактов с липосомами),  $R_c$  – эквивалентное сопротивление области контактов с липосомами (рис. 4, а),  $R_v$  – эквивалентное сопротивление липосомальной мембраны и  $R_p$  – эквивалентное сопротивление помпы.

Нами были сделаны следующие предположения: сопротивление помпы и/или канала светочувствительных белков очень большое в отсутствие освещения ( $R_p, R_{ch} \gg R_m, R_c, R_v$ ) и существенно уменьшается при освещении ( $R_p, R_{ch} \approx R_m, R_c$ ). Также очевидно, что в случае высокой ионной проводимости липидной мембраны липосом ( $R_v \rightarrow 0$ ), опосредованное каналом родопсина светоиндуцированное изменение тока будет ничтожно мало, так как ток пойдёт по наименьшему из сопротивлений (рис. 4, б). Поэтому важной задачей является недопущение уменьшения сопротивления липидной части липосом. При условии  $R_v \rightarrow \infty$  уравнение (1) сводится к двум следующим уравнениям:

мембранный ток в темноте —

$$I_d = \frac{E_e}{R_m}, \quad (1a)$$

и мембранный ток при освещении —

$$I_L = \frac{E_e}{R_m} + \frac{E_e R_p + (E_p + E_e) R_{ch}}{R_c R_p + (R_c + R_p) R_{ch}}. \quad (1b)$$

Появление стационарного фототока при до-  
бавлении протонофора связано с тем, что ТТФБ  
значительно снижает сопротивление  $R_c$  для  
ионов водорода, что позволяет зарядам (ионам  
водорода), закачиваемым в липосомы протон-  
ной помпой, переходить на *цис*-сторону БЛМ.  
Изменение стационарного тока после включе-  
ния освещения описывается формулой:

$$\begin{aligned} \Delta I = I_L - I_d &= \frac{E_e \cdot (R_p + R_{ch}) + E_p \cdot R_{ch}}{R_c \cdot (R_p + R_{ch}) + R_p \cdot R_{ch}} = \\ &= \frac{E_e + E_p \cdot R_{ch} / (R_p + R_{ch})}{R_c + R_p \cdot R_{ch} / (R_p + R_{ch})}. \end{aligned} \quad (2)$$

Из уравнения (2) следует, что в частном слу-  
чае, когда белок обладает только помповой ак-  
тивностью и  $R_{ch} = \infty$ , то  $\Delta I = (E_e + E_p) / (R_c + R_p)$ .  
Линейная аппроксимация зависимости  $\Delta I$  от  
напряжения позволяет определить  $E_p = (E_p =$   
 $= -E_e$  при  $\Delta I = 0)$  и  $(R_c + R_p) = (R_c + R_p = E_p / \Delta I$   
при  $E_e = 0)$ .

Таким образом, в случае бактериородопсина  
из рис. 3, в можно определить, что  $E_p$  состави-  
ло 195, 182 и 143 мВ для рН 6,0, 7,0 и 7,8 соответ-  
ственно. Ранее было показано, что при измере-  
нии напряжения на БЛМ с адсорбированными  
bR-содержащими ПЛ в условиях постоянного  
освещения напряжение на мембране, при кото-  
ром фотоответ становился равен нулю, состави-  
ло ~300 мВ [5]. В другой работе при встраива-  
нии пурпурных мембран в БЛМ и измерении  
фототока при разных напряжениях путём  
экстраполяции вольт-амперной характери-  
стики фотоиндуцированного тока было обнаруже-  
но, что нулевой ток помпы наблюдается  
при 200 мВ (эксперимент проводился при  
рН 6,3) [8]. Из экспериментальных данных мы  
оценили сумму сопротивлений контакта с ли-  
посомами и помпой.  $(R_c + R_p)$  увеличивается с  
 $1,3 \cdot 10^9 \Omega$  при рН 6,0 до  $5,6 \cdot 10^9 \Omega$  при рН 7,8, что  
коррелирует с почти 4× увеличением  $R_m$   
(с 24 МΩ при рН 6,0 до 85 МΩ — при рН 7,8) и с  
хорошо известной рН-зависимостью работ-  
ты ТТФБ на БЛМ с максимумом проводимости  
при значении рН ~5 [42, 43].

В другом частном случае, когда белок обла-  
дает только канальными способностями ( $E_p = 0$   
и  $R_p = \infty$ ), уравнение (2) преобразуется  
в  $\Delta I = E_e / (R_c + R_{ch})$ . Линейная аппроксимация за-  
висимости  $\Delta I$  от напряжения позволяет опреде-  
лить  $(R_c + R_{ch})$  по формуле  $(R_c + R_{ch}) = E_e / \Delta I$ .

Если белок обладает способностями и пом-  
пы, и канала, то  $R_p \gg R_{ch}$ , и уравнение (2) при-  
мет вид:

$$\Delta I = \frac{E_e + E_p \cdot R_{ch} / R_p}{R_c + R_{ch}},$$

а при  $\Delta I = 0$ ,

$$E_p = -E_e \cdot \left(1 + \frac{R_p}{R_{ch}}\right). \quad (3)$$

Так как мы не знаем соотношение  $R_p / R_{ch}$ , то  
сложно с достаточной точностью оценить вели-  
чину  $E_p$ . Анализ вольт-амперных характери-  
стик ChR2 показывает, что  $-E_e$  при  $\Delta I = 0$  состав-  
ляет ~4 мВ при рН 6,0 (усреднение по четырём  
экспериментам) и увеличивается до 27 мВ  
при рН 8,1.  $(R_c + R_{ch})$  для эксперимента, приве-  
дённого на рис. 2, увеличивалось с  $0,43 \cdot 10^9 \Omega$   
при рН 6,0 до  $6,8 \cdot 10^9 \Omega$  — при рН 8,1, а сопротив-  
ление мембраны увеличилось с 34 МΩ до  
370 МΩ. В среднем по нескольким эксперимен-  
там при освещении белым светом для ChR2 —  
 $(R_c + R_{ch}) = 0,36 \pm 0,1 \text{ G}\Omega$  при рН 6,0. И хотя не  
совсем корректно сравнивать липосомы с бакте-  
риородопсином и канальным родопсином ChR2  
из-за некоторой разницы в концентрациях белка  
в ПЛ, оценка суммы сопротивлений контакта  
и белка в случае ChR2 даёт величину в 3,5 раза  
меньше, чем в случае bR (при одинаковом осве-  
щении белым светом и рН 6,0), что может быть  
связано со значительным светоиндуцирован-  
ным падением сопротивления белка в случае  
ChR2.

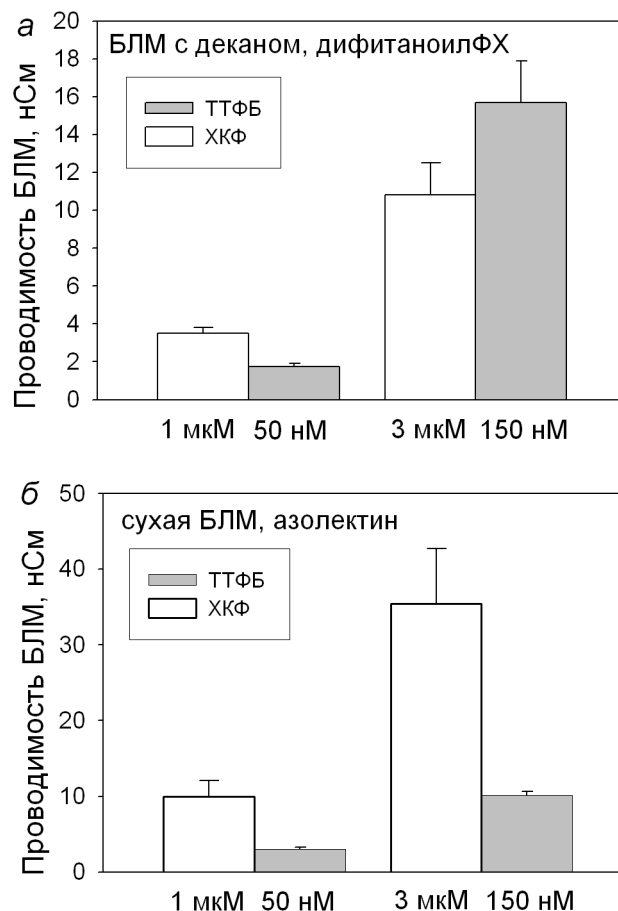
Известно, что канал ChR2 пропускает про-  
тоны, а также одно- и двухвалентные катионы.  
Поэтому при уменьшении концентрации ионов  
 $\text{Na}^+$  и протонов в водном растворе проводи-  
мость канала ChR2 должна значительно умень-  
шиться. Тогда в этих условиях  $R_{ch}$  увеличится и,  
согласно уравнению (3),  $E_p$  приблизится к зна-  
чению  $-E_e$  при  $\Delta I = 0$ . Мы измерили потенциал-  
зависимость фототока липосом с ChR2 в усло-  
виях 20 mM Tris-HCl, 20 mM Hepes и рН 6,8,  
и  $-E_e$  при  $\Delta I = 0$  составило ~60 мВ (данные не  
приведены). Таким образом, варьируя ионный  
состав буферного раствора, можно усиливать  
либо помповую, либо канальную активность  
светочувствительного белка. Измерения в кле-  
точных системах не всегда позволяют варьиро-  
вать условия эксперимента в широком диапазо-



не. Следует сказать, что нам не удалось обнаружить зависимость относительной амплитуды фототока ChR2 или напряжения нулевого тока от концентрации ионов Na<sup>+</sup> в омывающем растворе (в диапазоне 30–500 мМ) в присутствии протонофора ТТФБ и монензина. Это может быть объяснено тем, что селективность ChR2 по протону в ~10<sup>6</sup> раз выше селективности по натрию [13].

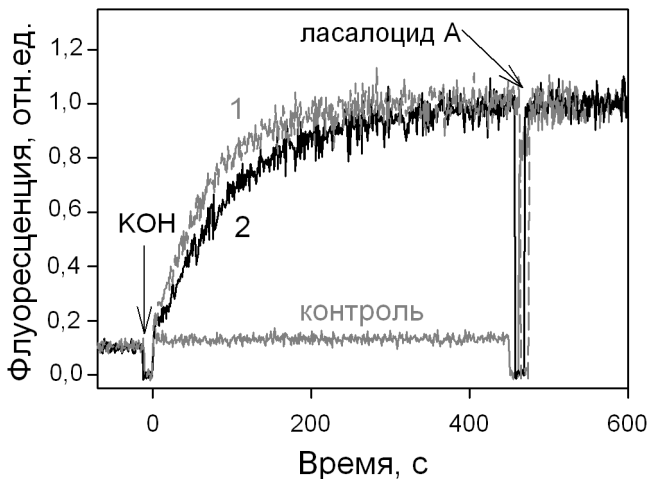
**Изучение влияния различных протонофоров на проводимость БЛМ и возможности их использования при измерении фототоков.** Мы также обнаружили, что амплитуда фототока сильно меняется при использовании различных протонофоров. Так в случае измерений в присутствии 5 мкМ ХКФ с *цис*-стороны мембраны при pH 6,0 проводимость мембраны возрастает до 7 нСм, однако стационарный фототок для липосом с ChR2 не превышает 1–2 рА и практически не зависит от приложенного напряжения. При добавлении 4 мкМ ХКФ после экспериментов с ТТФБ и липосомами с канальным родопсином относительная величина тока  $\alpha$  уменьшается в 2 и более раз, хотя  $R_m$  меняется при этом незначительно. При использовании протонофора ХКФ в случае липосом с бактериородопсином значения  $\Delta I$  были примерно в 10 раз меньше, чем в случае ТТФБ. Ранее похожие результаты с бактериородопсином были получены с протонофором ФКФ (карбонилцианид *n*-трифторометокси-фенилгидразон) в работе Vamberg et al. [39]. В экспериментах с бактериородопсин-содержащими ПЛ фототок возрастал в 5 раз при добавлении 0,1 мкМ ФКФ. Однако при добавлении 5 мкМ протонофора ФКФ  $\Delta I$  становилось равным нулю. Особенно сильное влияние было в случае низкой концентрации бактериородопсина в ПЛ. В то же время ТТФБ значительно увеличивал стационарный фототок в экспериментах с галородопсином. В дальнейших работах Vamberg et al. использовали протонофор 1799.

Поскольку при адсорбции ПЛ на поверхности БЛМ в модельной системе участвует два типа липидных мембран, мы предположили, что протонофоры могут по-разному встраиваться в положительно заряженную липидную мембрану (сформированную по методу Mueller et al. [32] с использованием декана в качестве растворителя) и мембрану липосом, образованную из липида азолектина и не содержащую растворителя. Для подтверждения этого предположения нами была измерена проводимость мембраны, сформированной из раствора 2%-ного дифитаноил-ФХ и 0,04%-ного димиристоилэтил-ФХ в декане, используемой для адсорбции ПЛ, и мембраны, сформированной из 2%-ного рас-



**Рис. 5.** Значения проводимости БЛМ (нСм) в присутствии протонофоров ТТФБ и ХКФ на БЛМ, сформированных из раствора дифитаноил-ФХ и димиристоилэтил-ФХ в декане (а) или азолектина в сквалене (б). Измерения проводили в условиях 5 мМ МЕС, 5 мМ Tris-HCl, 50 мМ KCl, pH 7,0. Приведены средние значения ± стандартная ошибка

вора азолектина в сквалене, при двух концентрациях ХКФ и ТТФБ (рис. 5). Считается, что при формировании БЛМ из липидного раствора в сквалене, также как в случае липосом, образуется мембрана, лишенная растворителя, так как сквален, в отличие от декана, не может располагаться между липидными монослоями и уходит на периферию БЛМ при её формировании [44]. Поэтому БЛМ из раствора в сквалене по толщине более близка к липосомальной липидной мембране, тогда как декановые мембраны имеют примерно вдвое большую толщину [45]. Оказалось, что в используемых концентрациях ХКФ значительно сильнее увеличивает проводимость сухой мембраны из раствора азолектина в сквалене, чем проводимость БЛМ из раствора дифитаноил-ФХ в декане. В то же время ТТФБ в концентрации 50 нМ сильнее увеличивает проводимость сухой мембраны, а при увеличении концентрации лучше работает в мемб-



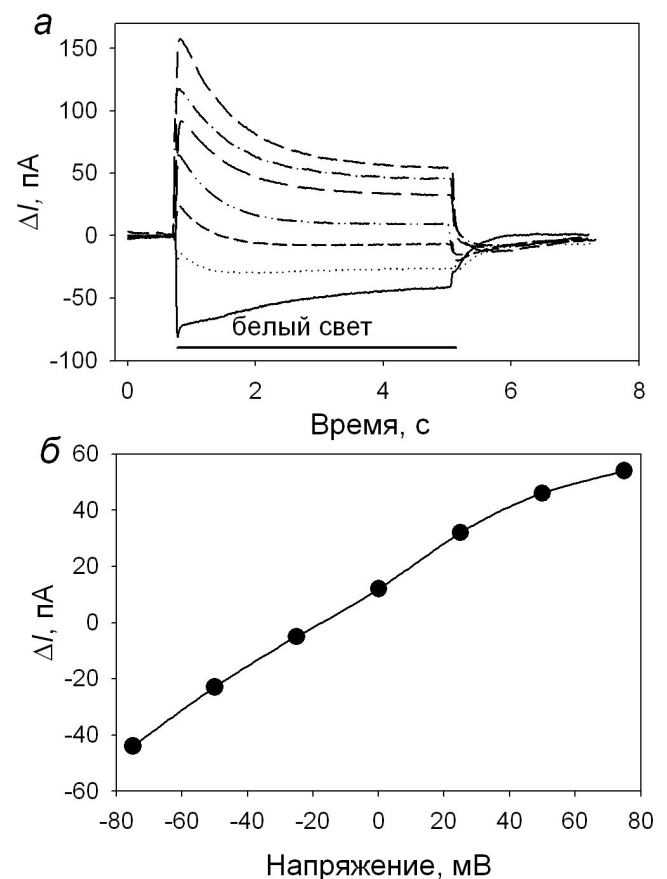
**Рис. 6.** Измерение способности протонофоров переносить протоны через липосомальную мембрану в модельной системе липосом, нагруженных флуоресцентным зондом пиранином. Кинетики изменения рН внутри липосом при отсутствии разобщителей (серая кривая, контроль), в присутствии 5 мкМ ХКФ (серая кривая, 1) или 12 мкМ ТТФБ (черная кривая, 2)

ране, сформированной из раствора в декане. По-видимому, это связано с тем, что ТТФБ функционирует в димерной форме на мембранах с деканом [42, 43]. Похожие результаты были получены ранее в работе Bakker et al. [46]. Авторы показали, что концентрационные зависимости проводимости БЛМ с деканом в качестве растворителя в присутствии различных протонофоров не коррелируют с их протонофорным действием на липосомах, измерение которого проводилось по валиномицин-индуцированному набуханию мультимембранных липосом или по восстановлению феррицианида, нагруженного в липосомы: ТТФБ сильнее увеличивал проводимость БЛМ, а ФКФ оказывал более сильное разобщающее действие на мембране липосом [46].

Такие же выводы можно сделать из наших опытов по сравнению протонофорного действия ТТФБ и ХКФ на липосомах, нагруженных рН-чувствительным флуоресцентным красителем пиранином (рис. 6). Соединения добавляли к липосомам в начале эксперимента при рН 6,0, затем в момент времени  $t = 0$  с, добавляя определенное количество оттитрованного раствора КОН, создавали градиент рН в две единицы на мембране липосом (рН снаружи увеличивался с 6,0 до 8,0). В контрольном эксперименте (серая кривая на рис. 5) рН внутри липосом практически не менялся, и только добавление ласалоцида А приводило к выравниванию внешнего и внутреннего рН на липосомальной мембране. Добавление протонофо-

ров ХКФ и ТТФБ значительно ускоряло процесс выравнивания рН, приблизительно одинаковая скорость изменения рН внутри липосом наблюдалась при 5 мкМ ХКФ и 12 мкМ ТТФБ (рис. 6). Однако для индуцирования приблизительно одинакового протонного тока на БЛМ, сформированной из раствора липида в декане, требовались концентрации ХКФ на порядок больше, чем ТТФБ (рис. 5). Значит, ХКФ в большей степени делает мембрану ПЛ проницаемой по протону, чем увеличивает проводимость БЛМ, на которой сорбируются липосомы. ТТФБ, напротив, сильнее увеличивает протонную проводимость плоской БЛМ, чем мембраны ПЛ.

Ранее при рассмотрении эквивалентной электрической схемы мы показали, что в случае высокой ионной проводимости липидной мембраны липосом ( $R_p \rightarrow 0$ ) светоиндуцирован-



**Рис. 7.** Потенциал-зависимые измерения фототоков канального родопсина в присутствии усниновой кислоты. *а* – Кинетики фототока через БЛМ с адсорбированными ПЛ с ChR2 в присутствии 4,5 мкМ усниновой кислоты с *цис*-стороны при напряжении от  $-75$  до  $+75$  мВ (с шагом 25 мВ) при освещении белым светом. Буферный раствор содержал 10 мМ Mes, 10 мМ Tris-HCl, 0,2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 500 мМ NaCl, рН 5,7. *б* – Зависимость величины стационарного фототока от приложенного напряжения

ное изменение сопротивления канала будет невозможно зарегистрировать, а стационарный ток при работе помпы будет очень мал, так как он в основном будет шунтироваться на липосомах. По-видимому, из-за быстрого проникновения через липидную мембрану добавление протонофора со стороны, противоположной добавлению ПЛ с бактериородопсином, не предотвращает увеличение протонной проводимости липосомальной мембраны. Дополнительные эксперименты с добавлением протонофора ТТФБ с *цис*- и *транс*-стороны показали, что величины фототока в случае ПЛ с бактериородопсином приблизительно одинаковы. Таким образом, из наших и литературных данных следует, что в экспериментах по изучению функций светочувствительных белков необходимо использовать протонофоры, которые сильнее увеличивают проводимость плоской БЛМ, на которой сорбируются липосомы, чем проводимость липосом: ТТФБ и, возможно, протонофор 1799 [47], который используется в лаборатории Ernst Bamberg.

Мы провели потенциал-зависимые измерения фототоков канального родопсина в присутствии усниновой кислоты [48], и также обнаружили почти симметричную по знаку напряжения потенциал-зависимость стационарного фототока (рис. 7). Однако в случае усниновой кислоты, кроме стационарного, наблюдался значительный спад фототока, который, по-видимому, связан с большим количеством заряженной формы протонофора и перераспределением ее в мембране липосом и БЛМ после включения света (рис. 7, а). Подобные кинетики спада тока были показаны в работе Bamberg et al. [39] на БЛМ с адсорбированными ПЛ с галородопсином в присутствии липофильного аниона тетрафенилбората, где благодаря работе хлорной помпы об-

разывался концентрационный градиент ионов  $\text{Cl}^-$ , а вслед за этим градиент тетрафенилбората на липосомальной мембране. При использовании нами динитрофенола в качестве протонофора стационарные фототоки оказались небольшими. Потенциал-зависимость фототока регистрировалась при очень кислых значениях pH (~2,8), относительное изменение тока  $\alpha$  было ~1%. При pH 5,0 и выше динитрофенол очень слабо увеличивал проводимость БЛМ.

Мы показали, что метод измерения фототоков при адсорбции липосом на поверхности БЛМ в присутствии протонофора и других переносчиков применим не только для изучения функционирования родопсинов помпового типа, но и родопсинов канального типа при регистрации потенциал-зависимости фототоков. Особое внимание должно быть уделено выбору используемого протонофора.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 19-04-00238), Российского Фонда Фундаментальных Исследований и Национального центра научных исследований в рамках научного проекта № 19-52-15017, а также при поддержке Государственного задания РФ (соглашение № 075-00337-20-03, проект FSMG-2020-0003).

**Благодарности.** Выражаем благодарность Christian Baeken за предоставление пурпурных мембран.

**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

- Oesterhelt, D., and Stoerkenius, W. (1973) Functions of a new photoreceptor membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2853-2857.
- Kayushin, L. P., and Skulachev, V. P. (1974) Bacteriorhodopsin as an electrogenic proton pump: reconstitution of bacteriorhodopsin proteoliposomes generating delta psi and delta pH, *FEBS Lett.*, **39**, 39-42.
- Oesterhelt, D., and Schuhmann, L. (1974) Reconstitution of bacteriorhodopsin, *FEBS Lett.*, **44**, 262-265.
- Drachev, L. A., Jasaitis, A. A., Kaulen, A. D., Kondrashin, A. A., Liberman, E. A., et al. (1974) Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase,  $\text{H}^+$ -ATPase and bacteriorhodopsin, *Nature*, **249**, 321-324.
- Drachev, L. A., Frolov, V. N., Kaulen, A. D., Liberman, E. A., Ostroumov, S. A., et al. (1976) Reconstitution of biological molecular generators of electric current. Bacteriorhodopsin, *J. Biol. Chem.*, **251**, 7059-7065.
- Siletsky, S. A., Mamedov, M. D., Lukashev, E. P., Balashov, S. P., Dolgikh, D. A., et al. (2019) Elimination of proton donor strongly affects directionality and efficiency of proton transport in ESR, a light-driven proton pump from *Exiguobacterium sibiricum*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1860**, 1-11.
- Herrmann, T. R., and Rayfield, G. W. (1978) The electrical response to light of bacteriorhodopsin in planar membranes, *Biophys. J.*, **21**, 111-125.
- Bamberg, E., Dencher, N. A., Fahr, A., and Heyn, M. P. (1981) Transmembranous incorporation of photoelectrically active bacteriorhodopsin in planar lipid bilayers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7502-7506.
- 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. Mechanism*, **5**, 277-292.
10. 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.
  11. Friedrich, T., Geibel, S., Kalmbach, R., Chizhov, I., Ataka, K., et al. (2002) Proteorhodopsin is a light-driven proton pump with variable vectoriality, *J. Mol. Biol.*, **321**, 821-838.
  12. Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A. M., et al. (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae, *Science*, **296**, 2395-2398.
  13. Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., et al. (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 13940-13945.
  14. Deisseroth, K. (2015) Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience, *Nat. Neurosci.*, **18**, 1213-1225.
  15. Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., and Deisseroth, K. (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity, *Nat. Neurosci.*, **8**, 1263-1268.
  16. McIsaac, R. S., Bedbrook, C. N., and Arnold, F. H. (2015) Recent advances in engineering microbial rhodopsins for optogenetics, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **33**, 8-15.
  17. Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., Li, H., and Spudich, J. L. (2017) Bacteriorhodopsin-like channelrhodopsins: alternative mechanism for control of cation conductance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E9512-E9519.
  18. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Janz, R., Liu, X., and Spudich, J. L. (2015) Natural light-gated anion channels: a family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics, *Science*, **349**, 647-650.
  19. Zabelskii, D., Alekseev, A., Kovalev, K., Rankovic, V., Balandin, T., et al. (2020) Viral rhodopsins 1: a unique family of light-gated ion channels, *Nat. Commun.*, **11**, 5707.
  20. Gradinaru, V., Zhang, F., Ramakrishnan, C., Mattis, J., Prakash, R., et al. (2010) Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics, *Cell*, **141**, 154-165.
  21. Chow, B. Y., Han, X., Dobry, A. S., Qian, X., Chuong, A. S., et al. (2020) High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps, *Nature*, **463**, 98-102.
  22. Kovalev, K., Astashkin, R., Gushchin, I., Orekhov, P., Volkov, D., et al. (2020) Molecular mechanism of light-driven sodium pumping, *Nat. Commun.*, **11**, 2137.
  23. Vogt, A., Silapetere, A., Grimm, C., Heiser, F., Moller, M. A., and Hegemann, P. (2019) Engineered passive potassium conductance in the KR2 sodium pump, *Biophys. J.*, **116**, 1941-1951.
  24. Kovalev, K., Polovinkin, V., Gushchin, I., Alekseev, A., Shevchenko, V., et al. (2019) Structure and mechanisms of sodium-pumping KR2 rhodopsin, *Sci. Adv.*, **5**, eaav2671.
  25. Maliar, N., Kovalev, K., Baeken, C., Balandin, T., Astashkin, R., et al. (2020) Crystal structure of the N112A mutant of the light-driven sodium pump KR2, *Crystals*, **10**, 496.
  26. Shevchenko, V., Mager, T., Kovalev, K., Polovinkin, V., Alekseev, A., Juettner, J., Chizhov, I., Bamann, C., Vavourakis, C., Ghai, R., Gushchin, I., et al. (2017) Inward H(+) pump xenorhodopsin: mechanism and alternative optogenetic approach, *Sci. Adv.*, **3**, e1603187.
  27. Gushchin, I., and Gordeliy, V. (2018) Microbial Rhodopsins, *Subcell Biochem.*, **87**, 19-56.
  28. Bratanov, D., Kovalev, K., Machtens, J. P., Astashkin, R., Chizhov, I., et al. (2019) Unique structure and function of viral rhodopsins, *Nat. Commun.*, **10**, 4939.
  29. Maliar, N., Okhrimenko, I. S., Petrovskaya, L. E., Alekseev, A. A., Kovalev, K. V., et al. (2020) Novel pH-sensitive microbial rhodopsin from *Sphingomonas paucimobilis*, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **495**, 342-346.
  30. Feldbauer, K., Zimmermann, D., Pintschovius, V., Spitz, J., Bamann, C., and Bamberg, E. (2009) Channelrhodopsin-2 is a leaky proton pump, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 12317-12322.
  31. Geibel, S., Friedrich, T., Ormos, P., Wood, P. G., Nagel, G., and Bamberg, E. (2001) The voltage-dependent proton pumping in bacteriorhodopsin is characterized by optoelectric behavior, *Biophys. J.*, **81**, 2059-2068.
  32. Mueller, P., Rudin, D. O., Tien, H. T., and Wescott, W. C. (1963) Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution, *J. Phys. Chem.*, **67**, 534-535.
  33. Volkov, O., Kovalev, K., Polovinkin, V., Borschhevskiy, V., Bamann, C., et al. (2017) Structural insights into ion conduction by channelrhodopsin 2, *Science*, **358**, eaan8862.
  34. Dencher, N. A., and Heyn, M. P. (1982) Preparation and properties of monomeric bacteriorhodopsin, *Methods Enzymol.*, **88**, 5-10.
  35. Chen, Y., Schindler, M., and Simon, S. M. (1999) A mechanism for tamoxifen-mediated inhibition of acidification, *J. Biol. Chem.*, **274**, 18364-18373.
  36. Gradmann, D., Berndt, A., Schneider, F., and Hegemann, P. (2011) Rectification of the channelrhodopsin early conductance, *Biophys. J.*, **101**, 1057-1068.
  37. Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., Wang, J., Li, H., and Spudich, J. L. (2013) Intramolecular proton transfer in channelrhodopsins, *Biophys. J.*, **104**, 807-817.
  38. Rayfield, G. W. (1982) Kinetics of the light-driven proton movement in model membranes containing bacteriorhodopsin, *Biophys. J.*, **38**, 79-84.
  39. Bamberg, E., Hegemann, P., and Oesterhelt, D. (1984) The chromoprotein of halorhodopsin is the light-driven electrogenic chloride pump in *Halobacterium halobium*, *Biochemistry*, **23**, 6216-6221.
  40. 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.
  41. Vodyanoy, I., Vodyanoy, V., and Lanyi, J. K. (1986) Current-voltage characteristics of planar lipid membranes with attached *Halobacterium* cell-envelope vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, **858**, 92-98.
  42. Liberman, E. A., and Topaly, V. P. (1968) Selective transport of ions through bimolecular phospholipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **163**, 125-136.
  43. Borisova, M. P., Ermishkin, L. N., Liberman, E. A., Silberstein, A. Y., and Trofimov, E. M. (1974) Mechanism of conductivity of bimolecular lipid membranes in the presence of tetrachlorotrifluoromethylbenzimidazole, *J. Membr. Biol.*, **18**, 243-261.
  44. White, S. H. (1978) Formation of "solvent-free" black lipid bilayer membranes from glyceryl monooleate dispersed in squalene, *Biophys. J.*, **23**, 337-347.
  45. Benz, R., Frohlich, O., Lauger, P., and Montal, M. (1975) Electrical capacity of black lipid films and of lipid bilayers made from monolayers, *Biochim. Biophys. Acta*, **394**, 323-334.
  46. Bakker, E. P., van den Heuvel, E. J., Wiechmann, A. H., and van Dam, K. (1973) A comparison between the effectiveness of uncouplers of oxidative phosphorylation in mitochondria and in different artificial membrane systems, *Biochim. Biophys. Acta*, **292**, 78-87.
  47. Tittor, J., Schweiger, U., Oesterhelt, D., and Bamberg, E. (1994) Inversion of proton translocation in bacteriorhodopsin mutants D85N, D85T, and D85,96N, *Biophys. J.*, **67**, 1682-1690.
  48. Antonenko, Y. N., Khailova, L. S., Rokitskaya, T. I., Nosikova, E. S., Nazarov, P. A., et al. (2019) Mechanism of action of an old antibiotic revisited: role of calcium ions in protonophoric activity of usnic acid, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 310-316.

**RHODOPSIN CHANNEL ACTIVITY CAN BE EVALUATED  
BY MEASURING THE PHOTOCURRENT VOLTAGE DEPENDENCE  
IN PLANAR BILAYER LIPID MEMBRANES****T. I. Rokitskaya<sup>1\*</sup>, N. Maliar<sup>2</sup>, K. V. Kovalev<sup>2,3</sup>,  
O. Volkov<sup>4,5</sup>, V. I. Gordeliy<sup>2,3,4,5</sup>, and Y. N. Antonenko<sup>1</sup>**<sup>1</sup> *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,  
119991 Moscow, Russia; E-mail: rokitskaya@genebee.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, 38044 Grenoble, France*<sup>4</sup> *Institute of Biological Information Processing (IBI-7: Structural Biochemistry),  
Forschungszentrum Jülich GmbH, 52425 Juelich, Germany*<sup>5</sup> *JuStruct: Jülich Center for Structural Biology, Forschungszentrum Jülich GmbH, 52425 Juelich, Germany*

The studies of the functional properties of retinal-containing proteins often include experiments in model membrane systems, e.g., measurements of electric current through planar bilayer lipid membranes (BLMs) with proteoliposomes adsorbed on one of the membrane surfaces. However, the possibilities of this method have not been fully explored yet. We demonstrated that the voltage dependence of stationary photocurrents for two light-sensitive proteins, bacteriorhodopsin (bR) and channelrhodopsin 2 (ChR2), in the presence of protonophore had very different characteristics. In the case of the bR (proton pump), the photocurrent through the BLM did not change direction when the polarity of the applied voltage was switched. In the case of the photosensitive channel protein ChR2, the photocurrent increased with the increase in voltage and the current polarity changed with the change in the voltage polarity. The protonophore 4,5,6,7-tetrachloro-2-trifluoromethyl benzimidazole (TTFB) was more efficient in the maximizing stationary photocurrents. In the presence of carbonyl cyanide-*m*-chlorophenylhydrazone (CCCP), the amplitude of the measured photocurrents for bR significantly decreased, while in the case of ChR2, the photocurrents virtually disappeared. The difference between the effects of TTFB and CCCP was apparently due to the fact that, in contrast to TTFB, CCCP transfers protons across the liposome membranes with a higher rate than through the decane-containing BLM used as a surface for the proteoliposome adsorption.

**Keywords:** retinal-containing proteins, channel rhodopsin, proton pump, proteoliposomes, bilayer lipid membrane, protonophore