

МЕХАНИЗМ ТРАНСЛОКАЦИИ ИОНОВ Na^+ -РОДОПСИНОМ

Обзор

© 2022 А.В. Богачев*, А.А. Байков, Ю.В. Берцова, М.Д. Мамедов

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119234 Москва, Россия; электронная почта: bogachev@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 03.04.2022

После доработки 10.05.2022

Принята к публикации 20.05.2022

В обзоре дано краткое описание структуры и транспортной функции недавно открытого семейства ретиналь-содержащих белков – Na^+ -транслоцирующих родопсинов. Особое внимание уделено кинетике генерации разности трансмембранных электрических потенциалов в ходе фотоцикла Na^+ -родопсина. Рассматриваемый механизм транспорта предполагает, что движущей силой для перемещения Na^+ из цитоплазмы внутрь белка служит локальное электрическое поле, создаваемое перемещением протона от основания Шиффа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Na^+ -транслоцирующий родопсин, преобразование энергии света, ретиналь, ионная помпа, катионный транспорт.

DOI: 10.31857/S0320972522080061, **EDN:** AXNDCH

ВВЕДЕНИЕ

Солнечный свет является основным источником энергии для биосферы Земли. В живой клетке энергия света преобразуется на первых этапах в разность окислительно-восстановительных потенциалов (ΔE_r) и/или протон-движущую силу (Δp). Поглощение света хлорофилл-содержащими фотосинтетическими реакционными центрами [1] сопровождается разделением зарядов и генерацией Δp по механизму Митчеловой редокс-петли. Принципиально иной способ преобразования световой энергии основан на использовании в качестве хромофора остатка ретиналя, способного к *цис*–*транс*-изомеризации под действием света. Поглощение фотона этим хромофором не приводит к протеканию окислительно-восстановительных реакций, и для трансмембранного переноса H^+ используется механизм ионной помпы, а не редокс-петли.

Впервые ретиналь-зависимое преобразование энергии света было открыто у бак-

териородопсина (bR) – трансмембранного белка из галофильной археи *Halobacterium salinarum* [2, 3]. bR образован тремя одинаковыми полипептидами с молекулярной массой 26 кДа. Каждая субъединица построена из семи трансмембранных α -спиралей [4] и содержит единственную простетическую группу – остаток ретиналя, образующий основание Шиффа с ϵ -аминогруппой остатка K216 (рис. 1) и работающий как «молекулярный рычаг». Благодаря системе сопряжённых двойных связей остаток ретиналя способен поглощать свет видимого диапазона. Поглощение кванта света вызывает *цис*–*транс*-изомеризацию ретиналя и создаёт конформационное напряжение в соседних с ним участках белка. Затем происходит релаксация в исходное состояние с совершением полезной работы, например транспорта иона. В цикле работы родопсинов-транспортёров обратимая изомеризация *транс*- в *цис*-форму происходит по двойной связи $\text{C}_{13}=\text{C}_{14}$, все остальные связи сохраняют *транс*-конформацию. Таким образом, реализуются две конформации ретиналя: (а) *полностью транс* и (б) *цис* – по связи $\text{C}_{13}=\text{C}_{14}$ и *транс* – по остальным двойным связям. Мы будем для краткости обозначать переходы между этими конформациями как *транс* \rightarrow *цис* и *цис* \rightarrow *транс*.

Принятые сокращения: bR – бактериородопсин; hR – галородопсин; NaR – Na^+ -транслоцирующий родопсин; SB – основание Шиффа; $\Delta\psi$ – трансмембранный электрический потенциал; Δp – протон-движущая сила.

* Адресат для корреспонденции.

Ключевые элементы структуры bR, участвующие в светозависимой генерации Δp , показаны на рис. 2, а. Поглощение фотона остатком ретиналя вызывает его *транс* → *цис*-изомеризацию, что приводит к понижению pK_a альдиминной группы (основания Шиффа, SB), которая протонирована в темновой форме bR. В результате SB депротонируется, и высвобождающийся протон переносится на D85, являющийся основным противоионом для положительно заряженного SB в темновой форме. Этот перенос вызывает высвобождение протона в водную фазу снаружи клетки с поверхностно расположенного кластера аминокислотных остатков, включающего в свой состав E204,

а также остатки E194 и R82 (для краткости на рис. 2, а и далее в тексте весь кластер обозначен как E204). Затем pK_a SB повышается до исходного значения, и SB снова протонируется, причём для этой цели используется ион H⁺, поступающий из цитоплазмы через промежуточный донор протона – остаток D96. Далее ретиналь возвращается в исходную *полностью транс*-конформацию, что сопровождается переносом протона от D85 к E204. Циклическое превращение bR обеспечивает, таким образом, перенос протона через мембрану [5].

В галофильных археях был обнаружен ещё один ретиналь-содержащий белок – галородопсин (hR) [6], являющийся светозависимой

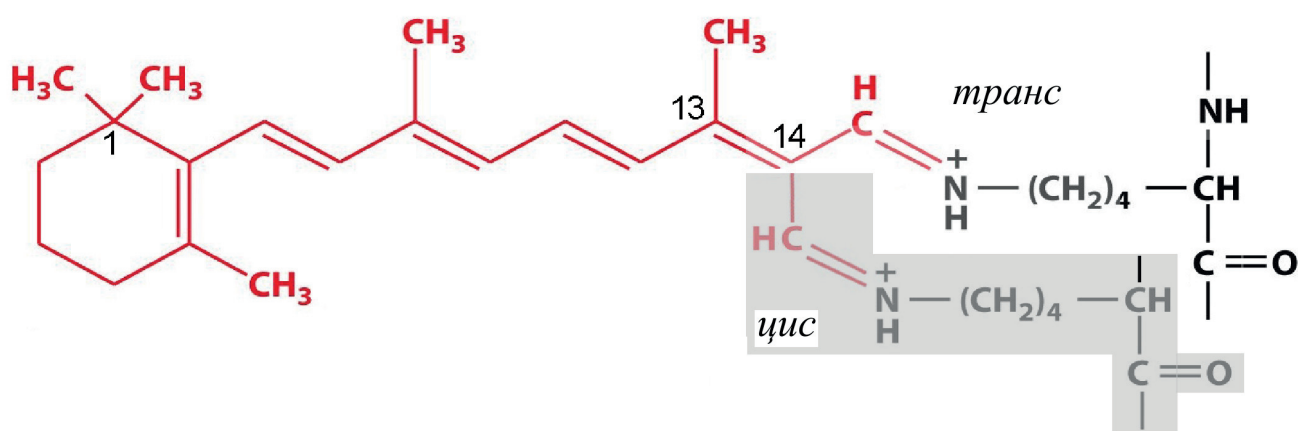


Рис. 1. Структура хромофора бактериородопсина. На белом фоне показан остаток ретиналя, ковалентно присоединённый к остатку лизина, в *полностью транс*-форме. На сером фоне показан фрагмент структуры в *цис*-конформации по связи C₁₃=C₁₄. Нумерация атомов начинается с диметилированного атома углерода β-иононового кольца

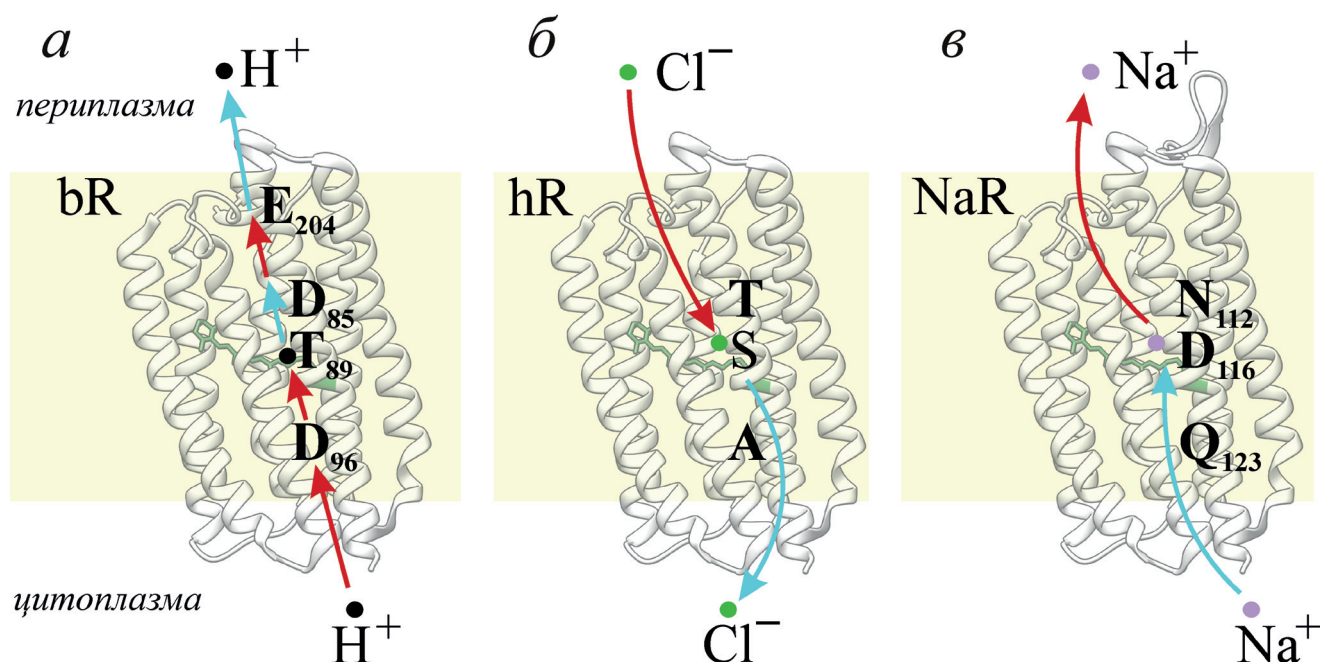


Рис. 2. Ионные потоки через цитоплазматическую мембрану прокариот, создаваемые различными родопсинами. Показаны ключевые аминокислотные остатки для bR (а), hR (б) и NaR (в). Пути светозависимого переноса ионов обозначены стрелками. Синие стрелки указывают движения ионов на ранних стадиях фотоцикла, красные – на завершающих стадиях

СГ⁻-помпой [7]. hR тоже состоит из семи транс-мембранных α -спиралей и содержит ковалентно-связанный остаток ретиналя, находящийся в *полностью транс*-конформации и в протонированном состоянии в темновой форме белка [8]. Однако при поглощении света hR переносит через мембрану не протон, а ион СГ⁻, причём в противоположном направлении – из внешней среды в цитоплазму (рис. 2, б). Ключевая особенность галородопсина состоит в том, что в нём на месте D85 бактериородопсина расположен остаток незаряженной аминокислоты (Т или N). Как следствие, hR в темновом состоянии содержит вблизи ретиналя ион СГ⁻, выступающий вместо D85 в качестве протоннона протонированному SB [8]. *Транс* → *цис*-изомеризация ретиналя hR при поглощении кванта света приводит к высвобождению связанного СГ⁻ внутрь клетки. Последующая *цис* → *транс*-реизомеризация сопровождается захватом СГ⁻, но уже с внешней стороны мембраны (рис. 2, б) [9]. Считается, что в hR основание Шиффа находится в протонированном состоянии в течение всего фотоцикла. Механизмы ионного транспорта у bR и hR довольно схожи, что подтверждается превращением bR из выкачивающей наружу H⁺-помпы в действующую в обратном направлении СГ⁻-помпу в результате одной аминокислотной замены D85T [10].

bR и hR менее эффективно преобразуют энергию света по сравнению с хлорофилл-содержащими фотосинтетическими электрон-транспортными цепями. Так, отношение $H^+ \uparrow / h\nu$ равно 1 в случае bR и 1,5–2 – для фотосинтетических электрон-транспортных цепей. Кроме того, у фотосинтетических реакционных центров выше квантовый выход светоиндуцируемых реакций и, за счёт развитых светособирающих антенн, лучше свето-поглощающие свойства. Поэтому долгое время считалось, что ретиналь-зависимые генераторы мембранного потенциала проиграли в ходе эволюционного отбора хлорофилл-содержащим реакционным центрам и сохранились лишь в виде реликтов в некоторых редких нишах с экстремальными условиями (например, у галофильных архей). Однако развитие метагеномных технологий позволило установить, что гены подобных бактериородопсину белков присутствуют у многих, прежде всего морских, микроорганизмов. Это, по-видимому, связано с удивительной простотой устройства и высокой стабильностью ретиналь-зависимых генераторов транс-мембранного потенциала. Эти белки состоят всего из одного небольшого полипептида и в большинстве случаев содержат в своём соста-

ве лишь одну простетическую группу. Скорее всего, именно низкая «стоимость» синтеза и поддержания этих белков служит причиной их частого применения организмами, функционирующими в условиях недостатка каких-либо нутриентов, например, морскими микроорганизмами. Таким образом, ретиналь-зависимые генераторы мембранного потенциала играют хотя и подчинённую, но существенную роль в преобразовании энергии света в современной биосфере Земли [11].

Анализ аминокислотных последовательностей большого количества bR-подобных белков позволил идентифицировать среди них группу, типичным представителем которой является белок KR2 из морской флавобактерии *Krokinobacter eikastus*. Отличительной особенностью этой группы является мотив NDQ, названный так по остаткам N112, D116 и Q123 (нумерация KR2), заменяющим, соответственно, критически важные для протонного транспорта остатки D85, T89 и D96 bR (мотив DTD/E). Такая замена не могла не сказаться на транспортности специфичности, и, действительно, Inoue et al. [12] показали, что KR2, в отличие от bR и hR, является светозависимой Na⁺-помпой (рис. 2, в). Позже Na⁺-транслоцирующие родопсины (NaR) были описаны и у других морских бактерий [13–17]. Из-за потенциальной возможности оптогенетического применения этого нового класса белков в паре с хорошо известными ретиналь-зависимыми катионными каналами в последние годы проводились интенсивные исследования Na⁺-родопсинов.

В данном обзоре мы суммируем имеющиеся сведения о NaR с акцентом на анализ кинетики генерации разности трансмембранных электрических потенциалов в ходе фотоцикла Na⁺-родопсина. На основе полученных данных предлагается существенно модифицированный механизм действия этой уникальной натриевой помпы.

Трёхмерная структура Na⁺-транслоцирующего родопсина

Вскоре после открытия Na⁺-транслоцирующих родопсинов была получена серия трёхмерных структур различных форм NaR из *K. eikastus* с атомным разрешением [18, 19]. Оказалось, что они довольно похожи на структуры bR (RMSD для C α -атомов – около 1,8 Å). Как и bR, NaR состоит из семи трансмембранных α -спиралей и содержит в качестве хромофора остаток ретиналя, ковалентно связанный с остатком K255. Однако, в отличие от bR, NaR

образует пентамер, а не тример [18, 20]. Ещё одной отличительной особенностью Na⁺-родопсинов является наличие дополнительной короткой N-концевой α-спирали (N-helix), экспонированной в периплазму, и видоизменённой периплазматической петли, соединяющей вторую и третью трансмембранные спирали. Эти элементы участвуют в образовании периплазматических межсубъединичных контактов и важного для олигомеризации Na⁺/K⁺-связывающего центра между субъединицами [18, 21]. Модификация этих элементов сайт-направленным мутагенезом влияет на олигомеризацию и термостабильность NaR, но не приводит к существенному изменению его Na⁺-помпирующей функции [12, 19].

Кроме того, темновая форма NaR отличается от bR наличием гидрофильной полости, ведущей от ориентированной в цитоплазму поверхности белка к остатку Q123, соответствующему первичному донору протонов D96 для репротонирования SB в bR. В фотоцикле bR открытие щели, соединяющей SB с цитоплазмой и, соответственно, обеспечивающей доступ к остатку D96, происходит кратковременно, при образовании интермедиата M [22, 23]. Таким образом, темновая форма NaR более

подготовлена к прохождению цитоплазматических ионов в область SB.

В области SB наблюдаются и другие важные различия между NaR и bR. Основным противополоионом SB⁺ в bR является D85 (рис. 3, б), связанный водородной связью с T89 [4]. Поскольку в NaR эти остатки заменены на N112 и D116 [24], положение противополоиона для SB⁺ в NaR смещено на один виток α-спирали в сторону цитоплазмы. В bR противополоион располагается «над» SB, а в NaR – «сбоку» от SB (рис. 3). Смещение противополоиона в Na⁺-родопсине вызывает искривление остатка ретиналя в области SB, который смещается из плоскости своего π-сопряжения в противоположном направлении по сравнению со всеми другими исследованными родопсинами [19, 25].

При близких к нейтральным значениям pH D116 связан в NaR цепью водородных связей с расположенным «над» SB остатком D251 (рис. 3, а), являющимся аналогом D212 bR (рис. 3, б). Аминокислотные остатки, образующие сеть водородных связей в области SB (S70, R109, N112, D116, D251), необходимы для транспорта Na⁺, мутагенез этих остатков приводит к существенному замедлению или полному прекращению Na⁺-транспорта [12, 14, 18, 19].

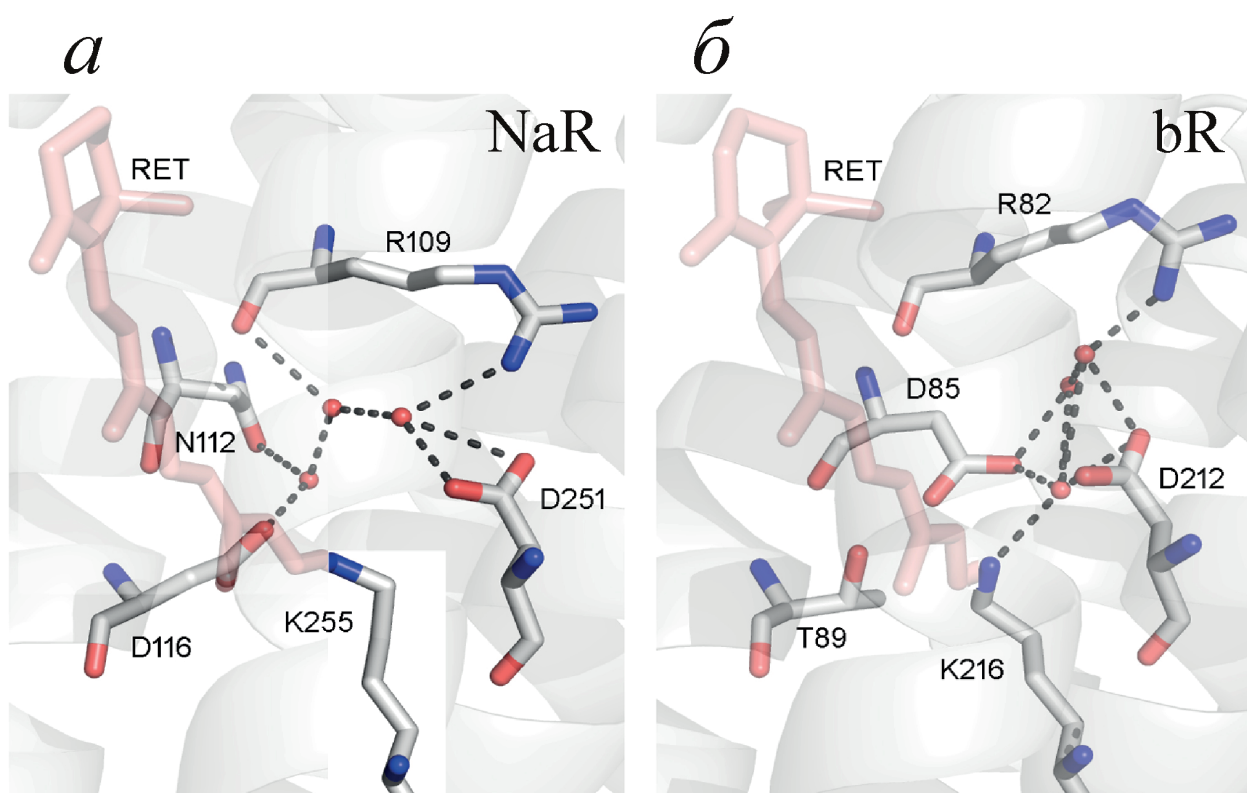


Рис. 3. Фрагменты структур NaR (а) и bR (б) в области основания Шиффа. Остаток ретиналя (RET) показан в виде стержневой модели розового цвета, молекулы воды обозначены красными сферами, водородные связи, образуемые тремя молекулами воды, – штриховыми линиями. Остатки лизина (K255 или K216) образуют альдиминную связь с остатком ретиналя. Коды PDB соответствующих полных структур NaR и bR – 4XTN (цепь А) и 1C3W. Рисунок создан с помощью программы PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0, Schrödinger, LLC)

Важно, что структуры темновой формы NaR не выявили в области SB связанного иона натрия. Обнаруженный периферический (периплазматический) сайт связывания Na^+ (см. выше) не участвует в его транслокации, а служит лишь для олигомеризации NaR. На основании этих данных можно заключить, что связывание помпируемого иона Na^+ с NaR (в отличие от связывания H^+ и Cl^- с bR и hR соответственно) не наблюдается в темновой форме родопсина, а происходит лишь в ходе фотоцикла (рис. 2, в) [14, 18, 19].

По первичной и третичной структурам Na^+ -родопсина ближе всего к ксантородопсинам, способным, наряду с ретиналем, связывать дополнительный хромофор (кето-каротиноид) [26], выступающий в роли светособирающей антенны [27]. Интересно, что на поверхности NaR обнаружена гидрофобная полость, похожая на полость для связывания салиниксантина в ксантородопсине из *Salinibacter ruber* [18, 19]. Это позволило предположить, что *in vivo* NaR также содержит каротиноидную антенну. Однако дальнейшие исследования не обнаружили у Na^+ -родопсина способность связывать антенные каротиноиды [28]. Оказалось, что этому связыванию препятствует наличие в NaR объёмного остатка T216 в позиции остатка G201 ксантородопсина *S. ruber* [29]. Обратная замена T216G сайт-направленным мутагенезом возвратила NaR из *Dokdonia* sp. PRO95 утраченную в ходе эволюции способность связывать кето-каротиноид (кантаксантин или эхиненон) и использовать его в качестве антенны [29].

ФОТОЦИКЛ Na^+ -ТРАНСЛОЦИРУЮЩИХ РОДОПСИНОВ

В темновом состоянии остаток ретиналя NaR находится в *полностью транс*-конформации, и его SB протонирован. Поглощение кванта света (максимум поглощения различных NaR находится при ~ 525 нм) приводит к образованию возбуждённого состояния (S_1) и последующей *транс* \rightarrow *цис*-изомеризации остатка ретиналя с $\tau = 180$ фс (образование интермедиата J). Диссипация избыточной колебательной энергии J приводит к образованию первого устойчивого интермедиата K ($\tau = 500$ фс, рис. 4). Эти стадии фотоцикла одинаковы для NaR и bR, однако в случае NaR переходы $S_1 \rightarrow J$ и $J \rightarrow K$ происходят, соответственно, в 3 и 6 раз быстрее [30].

Далее в фотоцикле NaR происходит депротонирование SB и образуется интермедиат M. Регистрируемое количество этого интермедиата у NaR (и многих H^+ -транслоцирующих протеродопсинов [31]) существенно ниже, чем у bR. Это, возможно, связано с высокой скоростью распада M по сравнению со скоростью его образования у протеродопсинов из-за образования части цепи водородных связей между SB и первичным донором протона уже в темновом состоянии [26, 32]. Однако в случае NaR малый выход M, скорее, связан с наличием равновесия между интермедиатами L и M (рис. 4) [12]. Скорость образования M в фотоцикле NaR ($\tau \approx 25$ мкс – два параллельных процесса с $\tau_1 = 7$ мкс и $\tau_2 = 40$ мкс) заметно

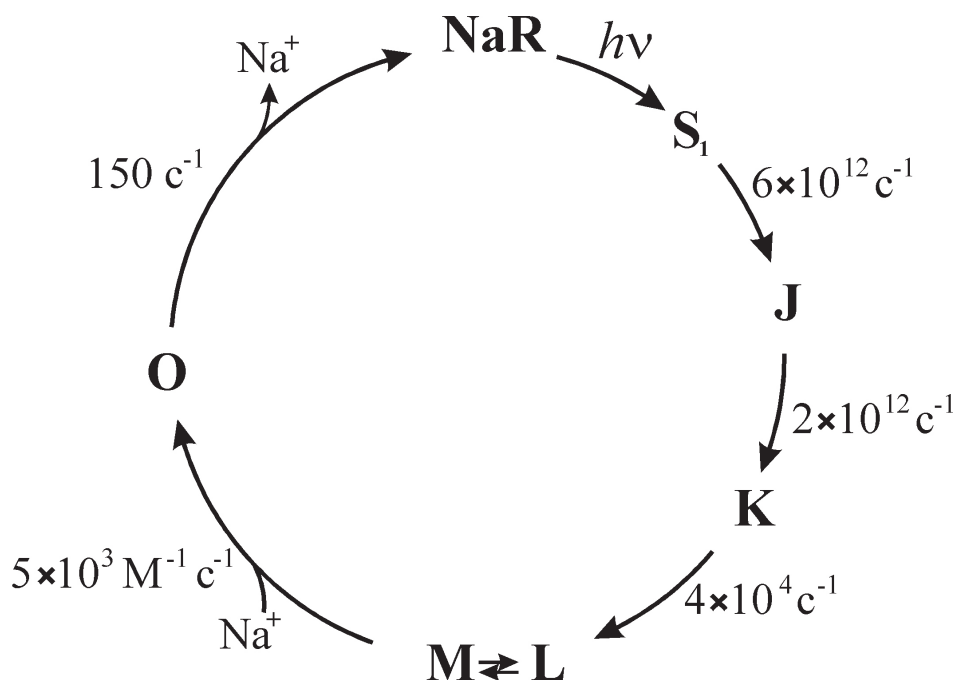


Рис. 4. Фотоцикл натрий-транслоцирующего родопсина

выше, чем у bR [12, 14, 33]. Это, по-видимому, связано с наличием облегчающей перенос H⁺ водородной связи между SB⁺ и первичным акцептором протона (D116) уже в темновом состоянии NaR [18, 19]; в случае bR цепь водородных связей между SB и D85 формируется лишь в ходе фотоцикла [34].

Распад M приводит к образованию интермедиата O. Это единственная стадия фотоцикла NaR, скорость которой зависит от концентрации Na⁺ в среде измерения [12, 14, 33]. Отсюда следует, что именно на этой стадии происходит захват этого иона белком. В экспериментах на непроницаемых для Na⁺ липосомах было показано, что переход M → O ускоряется лишь под действием ионов Na⁺, находящихся с «цитоплазматической» стороны мембраны [33]. Зависимость скорости образования интермедиата O от концентрации Na⁺ имеет строго линейный характер вплоть до 1 M [14, 33]. Этот факт указывает на отсутствие предреакционного комплекса с Na⁺ и лимитирование его связывания диффузией катиона к месту связывания. Бимолекулярная константа скорости присоединения Na⁺ (образование интермедиата O) к NaR из *Dokdonia* sp. PRO95 ($k_b^{Na^+}$) составляет примерно $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$ [33], что на 4–6 порядков ниже, чем для диффузионно-контролируемой реакции, например, связывания Na⁺ на поверхности белка [35–37]. Отсюда следует, что доступ катиона к месту его связывания затруднён, вероятно, из-за того, что оно расположено внутри NaR.

Наблюдение за изомеризацией остатка ретиналя в фотоцикле NaR с помощью инфракрасной Фурье- и твердотельной ЯМР-спектроскопии [14, 38], а также прямые определения 3D-структур интермедиатов [39] показали, что в интермедиате O этот хромофор находится в искажённой *полностью транс*-конформации. Таким образом, реизомеризация ретиналя NaR происходит на стадии M → O фотоцикла.

Распад интермедиата O приводит к регенерации исходного темнового состояния NaR, скорость этой стадии не зависит от концентрации Na⁺ [33]. Так как темновая форма NaR не содержит связанного иона натрия [18, 19], считается, что переход O → NaR сопряжён с выбросом Na⁺ с периплазматической стороны мембраны. Недавно это предположение было подтверждено прямыми экспериментами: с помощью Na⁺-селективной мембраны и прямой электрометрии было показано, что переход M → O в NaR сопровождается захватом Na⁺ из среды измерения, тогда как переход O → NaR сопряжён с выбросом иона натрия из белка [40].

СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ ПЕРЕНОСА Na⁺ В ХОДЕ ФОТОЦИКЛА NaR

Недавно Skopintsev et al. [41] получили с помощью рентгеновского лазера на свободных электронах серию структур NaR из *K. eikastus* на разных стадиях его фотоцикла. Было показано, что светозависимая *транс* → *цис*-изомеризация остатка ретиналя NaR, так же, как и в bR, происходит менее, чем за 2 пс. Однако в NaR ретиналь сдвигается при изомеризации не к цитоплазматической стороне мембраны, как у bR, а «вбок», к α-спирали 3. Это хорошо согласуется с описанным выше искривлением ретиналя в темновой форме NaR в противоположном направлении по отношению ко всем известным на сегодняшний день родопси-нам [19, 25].

Дальнейшие существенные структурные изменения происходят при образовании интермедиата (интермедиатов) O. Через 1 мс после инициации фотоцикла в структуре NaR обнаруживается ион Na⁺, связанный над SB с боковыми группами остатков D251 и N112 (рис. 5, центр II). Увеличение времени задержки до 20 мс приводило к исчезновению Na⁺ из центра II и его появлению в новом месте связывания вблизи периплазматической поверхности белка (рис. 5, центр III). В центре III Na⁺ взаимодействует с боковыми группами остатков E11, N106 и E160. Для связывания Na⁺ в обоих центрах важен сдвиг остатков аргинина (R109 – в центре II и R243 – в центре III) [41].

Практически одновременно 3D-структура интермедиата O фотоцикла NaR была получена с помощью альтернативного метода шоковой заморозки [39]. Этот подход также выявил связывание Na⁺ с NaR в состоянии O. Однако место связывания катиона (центр I на рис. 5) не совпало с центрами II и III, описанными Skopintsev et al. [41]. Центр I расположен в непосредственной близости от SB, и Na⁺ в нём координирован боковыми группами S70, N112 и D116, а также атомом кислорода пептидной группы остатка V67 [39].

Различие данных, полученных двумя группами [39, 41], можно объяснить только тем, что эти структуры соответствуют разным промежуточным состояниям в процессе переноса Na⁺. Скорее всего, все три центра связывания Na⁺ являются функционально значимыми, и последовательность переноса этого иона в NaR такова: цитоплазма → центр I → центр II → центр III → периплазма. Различная кинетическая устойчивость интермедиатов этого переноса может определяться разным олигомерным строением NaR в ис-

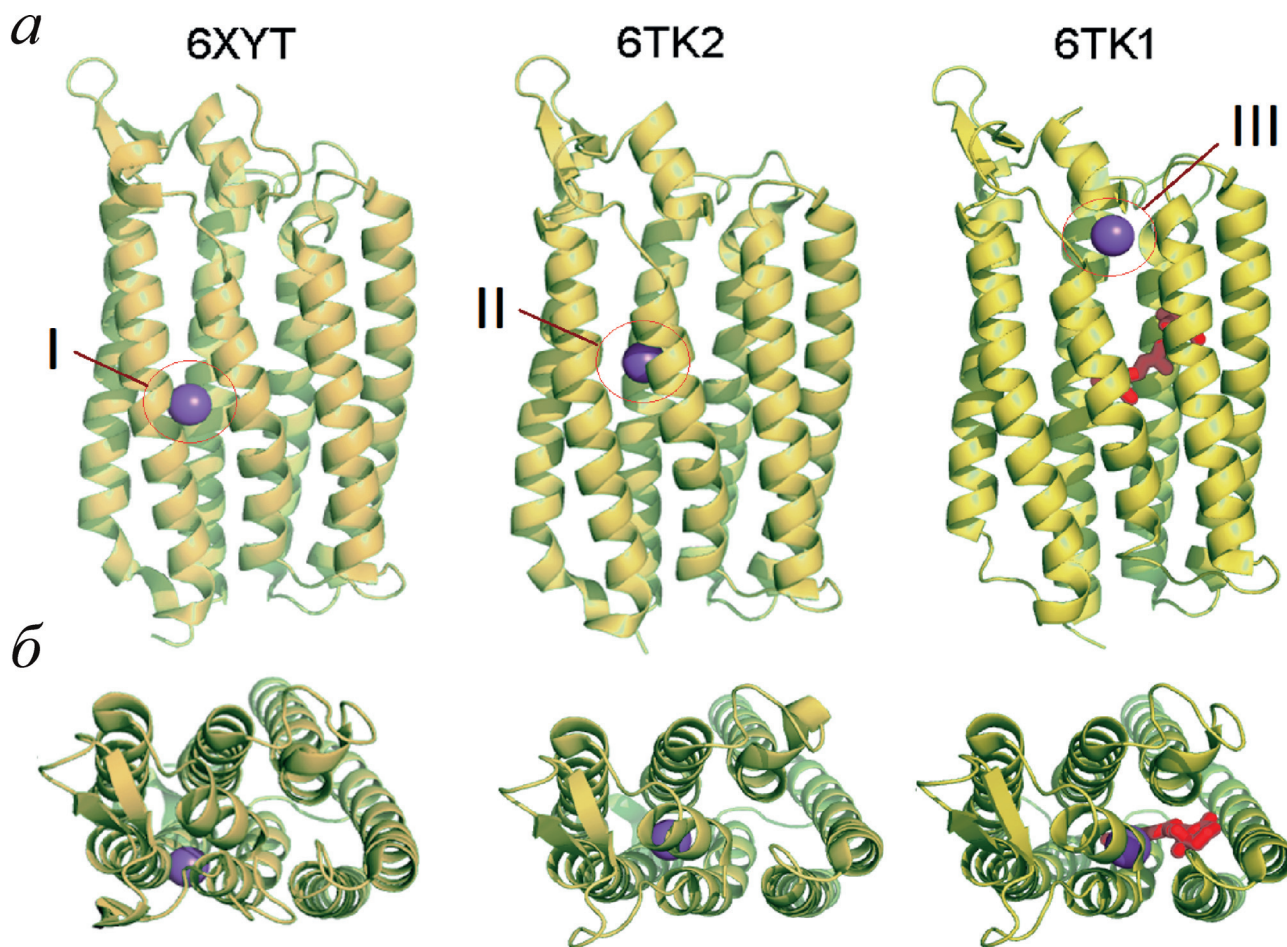


Рис. 5. Положения иона Na^+ (фиолетовая сфера) в различных структурах NaR из *K. eikastus*, соответствующих различным стадиям фотоцикла. *a* – Вид сбоку; *б* – вид сверху (с периплазматической стороны мембраны). Различные центры связывания Na^+ указаны римскими цифрами. В правой структуре красным цветом изображен остаток ретиналя. Сверху приведены коды структур в базе данных PDB [39, 41]

пользованных кристаллах. Skorintsev et al. [41] работали с мономерной формой NaR, тогда как в работе Kovalev et al. [39] этот белок кристаллизовали в виде пентамера. С этим объяснением согласуется существенное различие темновых структур NaR в области SB для мономерной и пентамерной форм белка [18].

КАТИОННАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ Na^+ -РОДОПСИНА

NaR может транспортировать не только Na^+ , но и Li^+ , а в отсутствие этих катионов – становится способным к помпированию протонов, хоть и с очень медленным оборотом фотоцикла [12]. Исходя из такой катионной специфичности, было предположено, что внутри белка катионы переносятся в дегидратированном виде, и поэтому селективность NaR определяется сечением формирующегося в ходе фотоцикла катион-проводящего канала, ведущего от цитоплазматической поверхности

белка к области SB [42]. Если это так, то увеличение входных ворот этого канала на цитоплазматической поверхности белка может привести к появлению способности NaR помпировать и большие моновалентные катионы. И действительно, размер ворот и катионную специфичность этого белка удалось изменить заменой N61 и/или G263, находящихся на разных трансмембранных спиральях, но соседствующих на цитоплазматической поверхности NaR, на остатки большего объема. Замены G263F и N61P/G263W привели к появлению у NaR K^+ -переносящей активности [18, 19], а замена N61L/G263F придала NaR способность переносить даже такой большой катион, как Cs^+ [42].

Исходя из описанной выше селективности NaR, можно предположить, что оптимальным помпируемым катионом для этого белка должен быть протон, так как он имеет наименьший ионный радиус. Действительно, в отсутствие Na^+ и Li^+ NaR проявляет H^+ -переносящую активность, величина которой зависит от источника Na^+ -родопсина [12, 14, 17,

43]. Анализ кинетики распада интермедиата М при различных концентрациях Na⁺ и значениях рН показал, что переключение с H⁺-зависимого на Na⁺-зависимый фотоцикл происходит в NaR при концентрациях натрия в десятки или сотни мкМ и концентрации протонов меньше 1 мкМ [14, 40, 44]. Таким образом, при равных концентрациях H⁺ и Na⁺ перенос протона более эффективен, а натриевая селективность NaR *in vivo* определяется тем, что соотношение концентраций Na⁺ и H⁺ в цитоплазме морских бактерий составляет $3,5 \times 10^6$ [44, 45].

МЕХАНИЗМ ТРАНСМЕМБРАННОГО ПЕРЕНОСА ИОНА НАТРИЯ РОДОПСИНОМ – НОВЫЙ ВЗГЛЯД

Ион Na⁺ помпирруется в результате трёх переходов между разными интермедиатами фотоцикла NaR. Считается [41, 46], что на первой стадии протон переносится внутри ионной пары, образованной протонированным основанием Шиффа и карбоксилатом D116, что нейтрализует взаимодействовавшие заряды и увеличивает расстояние между SB и D116. Это открывает доступ Na⁺ из цитоплазмы в промежуточный центр связывания внутри белка. Связывание Na⁺ (при переходе М → О) вызывает обратный перенос протона от D116 к SB с образованием ионной пары, что перекрывает канал, связывающий область SB с цитоплазматической стороной мембраны. Переход О → NaR уменьшает сродство белка к Na⁺, что вызывает его выход в периплазму.

Новые данные позволяют существенно детализировать и дополнить этот механизм, сохраняя его основу. Прежде всего они позволяют объяснить способ доставки Na⁺ из цитоплазмы внутрь NaR. Исходя из катионной селективности NaR, считается, что Na⁺ движется внутрь белка в дегидратированном виде [42]. Известно, что дегидратация катионов и их перенос в среде с низкой диэлектрической проницаемостью требует затраты очень большого количества энергии [47]. Более того, при функционировании NaR *in vivo* движение Na⁺ из цитоплазмы к центру белка происходит при высокой (порядка 200 мВ) противодействующей трансмембранной разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$). Этой разности соответствует напряженность электрического поля внутри мембраны около 500 кВ/см, что должно сильно затруднить движение катиона. Таким образом, при функционировании NaR должна быть какая-то движущая сила, обеспечивающая компенсацию энергии дегидратации Na⁺ и его движения про-

тив электрического поля. В ферментах дыхательной цепи (наиболее подробно это описано для цитохром *c*-оксидазы) захват помпиремого катиона может происходить за счёт транспорта электрона на редокс-активную простетическую группу, находящуюся в мембранной части катионной помпы [48–50]. Компенсация заряда образованного таким образом аниона за счёт захвата катиона с цитоплазматической стороны мембраны энергетически выгодна, а локальное электрическое поле вокруг аниона может служить движущей силой для этого захвата. В родопсинах транспорта электронов не происходит, что, однако, не исключает возможности использования принципа локальной электронейтральности стабильных интермедиатов [48]. И это подтверждается данными, полученными методом прямой электрометрии.

Этот метод весьма информативен при изучении кинетики трансмембранного перемещения заряда в ходе каталитического оборота генераторов мембранного потенциала, в частности ферментов фотосинтетических электрон-транспортных цепей, терминальных оксидаз и родопсинов [51–54]. В приложении к NaR он показал наличие трёх фаз генерации электрического потенциала при однократном обороте Na⁺-родопсина из *Dokdonia* sp. PRO95 (рис. 6) [33]. Первая фаза (в первом прибли-

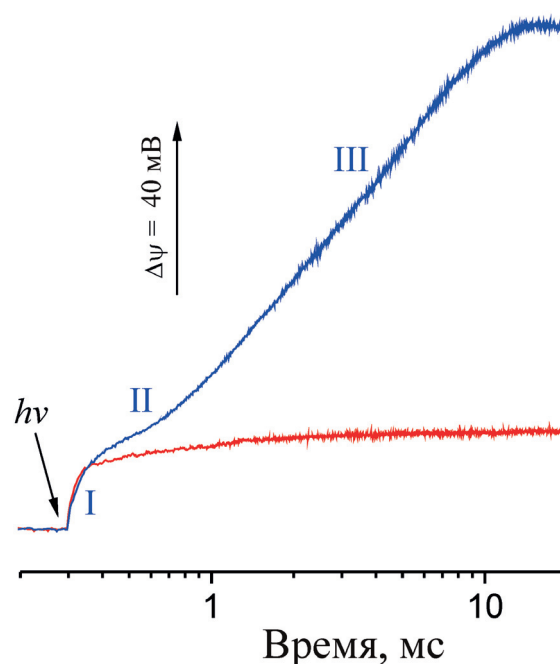


Рис. 6. Генерация $\Delta\psi$ NaR-содержащими протеолипосомами. Показана кинетика генерации $\Delta\psi$ в ответ на лазерную вспышку ($h\nu$) в среде, содержащей 200 мМ NaCl (синяя кривая) или KCl (красная кривая) [33]. Три фазы генерации $\Delta\psi$ помечены римскими цифрами

жении, перенос заряда на $\sim 0,15$ толщины мембраны) соответствовала переходу $K \rightarrow (L \leftrightarrow M)$ фотоцикла NaR. Следует отметить, что оценка $0,15$ является минимальной, так как неизвестно, насколько равновесие $L \leftrightarrow M$ в NaR смещено в сторону M. Скорость первой фазы генерации $\Delta\psi$ не зависела от концентрации Na^+ в среде измерения, однако она замедлялась в 1,4 раза при замене H_2O на D_2O . На основании этих данных был сделан вывод, что первая фаза генерации $\Delta\psi$ связана с перемещением протона внутри белка в сторону периплазмы [33]. Так как SB и первичный акцептор протона D116 расположены практически параллельно поверхности мембраны, то перенос H^+ между этими группами не может объяснить высокой электрогенности перехода $K \rightarrow M$. Вероятно, при образовании интермедиата M протон не задерживается на D116, а переносится на D251 (рис. 7). Эти две группы связаны между собой цепью водородных связей (рис. 3) [18, 19], поэтому данный перенос может протекать быстро по эстафетному механизму. Перемещение протона внутри NaR должно приводить к образованию ярко выраженного диполя, то есть практически

нескомпенсированного отрицательного заряда внутри мембраны на остатке D116. Это состояние аналогично возникающему в редокс-зависимой катионной помпе при появлении отрицательного заряда на электрон-акцепторной простетической группе. В электрогенез первой фазы генерации $\Delta\psi$ может вносить вклад и выброс протона во внешнюю среду с какой-то поверхностной группы белка, так как образование интермедиата M в NaR из *Gillisia limnaea* сопровождается закислением среды [14].

Вторая фаза генерации $\Delta\psi$ (также перенос заряда на $\sim 0,15$ толщины мембраны) соответствовала образованию интермедиата O [33]. Эта фаза не наблюдалась при отсутствии Na^+ и, по-видимому, связана с захватом этого иона из цитоплазмы и его связыванием в центре белка. Однако низкая амплитуда этого процесса указывает на компенсирующий электрогенный процесс, которым может быть обратный транспорт протона от D251 к SB, и это предположение хорошо согласуется с протонированием SB при распаде интермедиата M. Третья фаза генерации $\Delta\psi$ (перенос заряда на $\sim 0,7$ толщины мембраны) соответствовала распаду интерме-

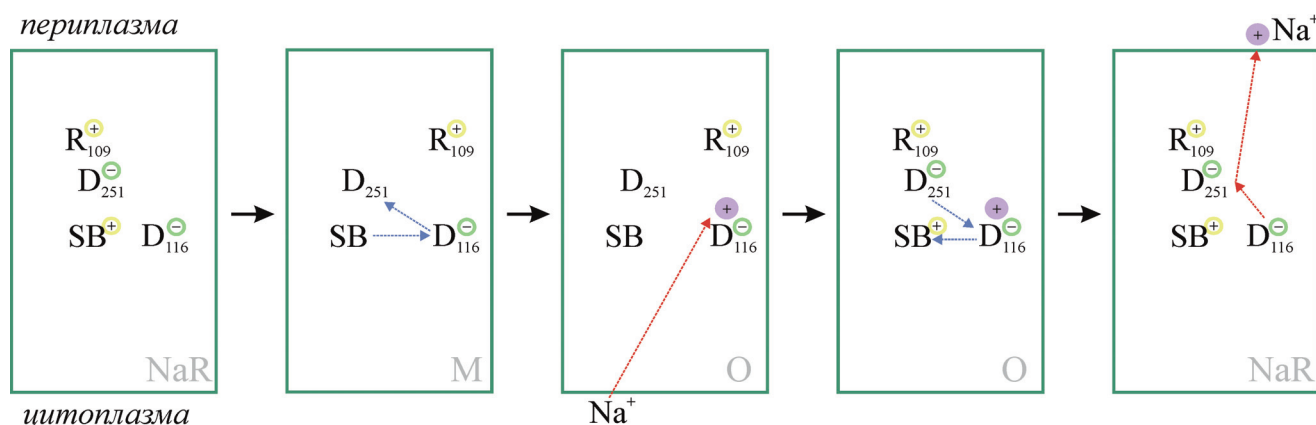


Рис. 7. Механизм работы Na^+ -родопсина в схематическом виде. Перенос протона показан синими стрелками, перенос Na^+ — красными. Интермедиаты фотоцикла NaR обозначены серым цветом. Указаны также заряды боковых групп ключевых аминокислотных остатков и основания Шиффа (SB)

Описание структурных изменений на трёх стадиях фотоцикла NaR

Стадия фотоцикла	Сопутствующие структурные изменения
NaR \rightarrow K \rightarrow M	изомеризация ретиналя, сдвиг pK_a основания Шиффа и перенос его протона на D116 и далее — на D251; в результате возникает нескомпенсированный отрицательный заряд в области D116 и открывается канал для входа Na^+ из цитоплазмы
M \rightarrow O	под действием электрического поля отрицательного заряда на D116 Na^+ проникает в центр связывания I внутри белка; обратный транспорт протона от D251 к основанию Шиффа перекрывает цитоплазматический канал и вызывает реизомеризацию ретиналя
O \rightarrow NaR	возврат протона к основанию Шиффа устраняет локальное электрическое поле, что делает нахождение Na^+ в середине мембраны энергетически невыгодным; Na^+ выбрасывается по механизму Кулоновской помпы [49] во внешнюю среду через центры II и III; этому способствует движение боковых групп R109 и R243 [41], открывающее выходные ворота

диата O [33]. Измеряемая скорость этой фазы снижалась практически до нуля при понижении [Na⁺] или [Li⁺], на основании чего был сделан вывод, что эта фаза связана с выбросом Na⁺ из белка во внеклеточную среду. Существенно, что для принятого в настоящее время механизма помпирования Na⁺ [41, 46] следует ожидать только две сопоставимые по амплитуде фазы генерации Δψ, сопряжённые с образованием и распадом интермедиата O и соответствующие захвату и выбросу Na⁺.

Уточнённая на основании этих данных схема работы NaR суммирована на рис. 7 и в дополняющей его таблице. В предлагаемом механизме анион D116 (центр I связывания Na⁺) выполняет роль загрузочного центра помпы («pump loading site»), пара SB–D116 – роль регулируемых входных ворот («input gate»), а R109 и/или R243 – роль регулируемых выходных ворот («output gate»). Движущей силой для захвата Na⁺ из цитоплазмы и его перемещения в центр I служит локальное электрическое поле, создаваемое депротонированным остатком D116, передающим протон от SB на D251.

Предлагаемый механизм помпирования NaR хорошо согласуется с описанной выше катионной селективностью этого белка, так как именно электростатические взаимодействия обладают слабой селективностью по отношению к взаимодействующим ионам. Также предлагаемый механизм подразумевает, что начальные этапы работы Na⁺-транслоцирующего и H⁺-транслоцирующего родопсинов очень похожи и заключаются в переносе H⁺ от SB в направлении к периплазматической стороне мембраны. Это указывает на возможность преобразования Na⁺-родопсина в H⁺-родопсин введением протонируемой группы (аналога D96 bR) в область катион-переноса цитоплазматического канала. Такая модификация должна повысить локальную концентрацию протонов в этом канале и переключить NaR на транспорт протонов даже при высокой концентрации Na⁺. И это предска-

зание уже было экспериментально подтверждено – одиночная замена Q123E действительно превратила NaR в H⁺-помпу [55].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Открытие Na⁺-транслоцирующего родопсина [12] опровергло долго существовавшую догму, что ретиналь-содержащие белки могут транспортировать анионы, а из катионов – только протон из-за невозможности связывания иного катиона в области положительно заряженного SB. Это, а также потенциально важная роль NaR в оптогенетике [56, 57] вызвали большой интерес к новому натриевому переносчику и, как следствие, быстрый прогресс в его изучении. NaR представляет собой одну из простейших ионных помп, поэтому исследование этого белка вносит существенный вклад в понимание молекулярного механизма работы не только ретиналь-зависимых генераторов мембранного потенциала, но также и многих других ионных помп.

Вклад авторов. А.В. Богачев и А.А. Байков написали статью. Ю.В. Берцова и М.Д. Мамедов подготовили рисунки и участвовали в обсуждении и редактировании. Все авторы прочли и одобрили окончательный вариант статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Соглашения № 075-15-2021-1354 от 07.10.2021.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Blankenship, R. E. (2014) *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*, 2nd Edn., Wiley-Blackwell, Oxford.
- Oesterhelt, D., and Stoekenius, W. (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*, *Nat. New Biol.*, **233**, 149-152, doi: 10.1038/newbio233149a0.
- Oesterhelt, D., and Stoekenius, W. (1973) Functions of a new photoreceptor membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2853-2857, doi: 10.1073/pnas.70.10.2853.
- Luecke, H., Richter, H. T., and Lanyi, J. K. (1998) Proton transfer pathways in bacteriorhodopsin at 2.3 angstrom resolution, *Science*, **280**, 1934-1937, doi: 10.1126/science.280.5371.1934.
- Ernst, O. P., Lodowski, D. T., Elstner, M., Hegemann, P., Brown, L. S., et al. (2014) Microbial and animal rhodopsins: structures, functions, and molecular mechanisms, *Chem. Rev.*, **114**, 126-163, doi: 10.1021/cr4003769.
- Matsuno-Yagi, A., and Mukohata, Y. (1977) Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 237-243, doi: 10.1016/0006-291x(77)91245-1.

7. Schobert, B., and Lanyi, J. K. (1982) Halorhodopsin is a light-driven chloride pump, *J. Biol. Chem.*, **257**, 10306-10313, doi: 10.1016/S0021-9258(18)34020-1.
8. Kolbe, M., Besir, H., Essen, L. O., and Oesterhelt, D. (2000) Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å resolution, *Science*, **288**, 1390-1396, doi: 10.1126/science.288.5470.1390.
9. Kalaidzidis, I. V., Kalaidzidis, Y. L., and Kaulen, A. D. (1998) Flash-induced voltage changes in halorhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*, *FEBS Lett.*, **427**, 59-63, doi: 10.1016/S0014-5793(98)00394-9.
10. Sasaki, J., Brown, L. S., Chon, Y. S., Kandori, H., Maeda, A., et al. (1995) Conversion of bacteriorhodopsin into a chloride ion pump, *Science*, **269**, 73-75, doi: 10.1126/science.7604281.
11. Béjà, O., Spudich, E. N., Spudich, J. L., Leclerc, M., DeLong, E. F. (2001) Proteorhodopsin phototrophy in the ocean, *Nature*, **411**, 786-789, doi: 10.1038/35081051.
12. Inoue, K., Ono, H., Abe-Yoshizumi, R., Yoshizawa, S., Ito, H., et al. (2013) A light-driven sodium ion pump in marine bacteria, *Nat. Commun.*, **4**, 1678, doi: 10.1038/ncomms2689.
13. Kwon, S. K., Kim, B. K., Song, J. Y., Kwak, M. J., Lee, C. H., et al. (2013) Genomic makeup of the marine flavobacterium *Nonlabens (Donghaeana) dokdonensis* and identification of a novel class of rhodopsins, *Genome Biol. Evol.*, **5**, 187-199, doi: 10.1093/gbe/evs134.
14. Balashov, S. P., Imasheva, E. S., Dioumaev, A. K., Wang, J. M., Jung, K. H., et al. (2014) Light-driven Na⁺ pump from *Gillisia limnaea*: a high-affinity Na⁺ binding site is formed transiently in the photocycle, *Biochemistry*, **53**, 7549-7561, doi: 10.1021/bi501064n.
15. Bertsova, Y. V., Bogachev, A. V., and Skulachev, V. P. (2015) Proteorhodopsin from *Dokdonia* sp. PRO95 is a light-driven Na⁺-pump, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 449-454, doi: 10.1134/S0006297915040082.
16. Li, H., Sineshchekov, O. A., da Silva, G. F., and Spudich, J. L. (2015) *In vitro* demonstration of dual light-driven Na⁺/H⁺ pumping by a microbial rhodopsin, *Biophys. J.*, **109**, 1446-1453, doi: 10.1016/j.bpj.2015.08.018.
17. Tsunoda, S. P., Prigge, M., Abe-Yoshizumi, R., Inoue, K., Kozaki, Y., et al. (2017) Functional characterization of sodium-pumping rhodopsins with different pumping properties, *PLoS One*, **12**, e0179232, doi: 10.1371/journal.pone.0179232.
18. Gushchin, I., Shevchenko, V., Polovinkin, V., Kovalev, K., Alekseev, A., et al. (2015) Crystal structure of a light-driven sodium pump, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 390-395, doi: 10.1038/nsmb.3002.
19. Kato, H. E., Inoue, K., Abe-Yoshizumi, R., Kato, Y., Ono, H., et al. (2015) Structural basis for Na⁺ transport mechanism by a light-driven Na⁺ pump, *Nature*, **521**, 48-53, doi: 10.1038/nature14322.
20. Shibata, M., Inoue, K., Ikeda, K., Konno, M., Singh, M., et al. (2018) Oligomeric states of microbial rhodopsins determined by high-speed atomic force microscopy and circular dichroic spectroscopy, *Sci. Rep.*, **8**, 8262, doi: 10.1038/s41598-018-26606-y.
21. Otomo, A., Mizuno, M., Inoue, K., Kandori, H., and Mizutani, Y. (2020) Allosteric communication with the retinal chromophore upon ion binding in a light-driven sodium ion-pumping rhodopsin, *Biochemistry*, **59**, 520-529, doi: 10.1021/acs.biochem.9b01062.
22. Skulachev, V. P. (1993) Interrelations of bioenergetic and sensory functions of the retinal proteins, *Q. Rev. Biophys.*, **26**, 177-199, doi: 10.1017/s0033583500004066.
23. Weinert, T., Skopintsev, P., James, D., Dworkowski, F., Panepucci, E., et al. (2019) Proton uptake mechanism in bacteriorhodopsin captured by serial synchrotron crystallography, *Science*, **365**, 61-65, doi: 10.1126/science.aaw8634.
24. Inoue, K., Nomura, Y., Kandori, H. (2016) Asymmetric functional conversion of eubacterial light-driven ion pumps, *J. Biol. Chem.*, **291**, 9883-9893, doi: 10.1074/jbc.M116.716498.
25. Matsuo, J., Kikukawa, T., Fujisawa, T., Hoff, W. D., Unno, M. (2020) "Watching" a molecular twist in a protein by Raman optical activity, *J. Phys. Chem. Lett.*, **11**, 8579-8584, doi: 10.1021/acs.jpcclett.0c02448.
26. Luecke, H., Schobert, B., Stagno, J., Imasheva, E. S., Wang, J. M., et al. (2008) Crystallographic structure of xanthorhodopsin, the light-driven proton pump with a dual chromophore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 16561-16565, doi: 10.1073/pnas.0807162105.
27. Balashov, S. P., Imasheva, E. S., Wang, J. M., and Lanyi, J. K. (2008) Excitation energy-transfer and the relative orientation of retinal and carotenoid in xanthorhodopsin, *Biophys. J.*, **95**, 2402-2414, doi: 10.1529/biophysj.108.132175.
28. Bertsova, Y. V., Arutyunyan, A. M., and Bogachev, A. V. (2016) Na⁺-translocating rhodopsin from *Dokdonia* sp. PRO95 does not contain carotenoid antenna, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 414-419, doi: 10.1134/S000629791604012X.
29. Anashkin, V. A., Bertsova, Y. V., Mamedov, A. M., Mamedov, M. D., Arutyunyan, A. M., et al. (2018) Engineering a carotenoid-binding site in *Dokdonia* sp. PRO95 Na⁺-translocating rhodopsin by a single amino acid substitution, *Photosynth. Res.*, **136**, 161-169, doi: 10.1007/s11120-017-0453-0.
30. Tahara, S., Takeuchi, S., Abe-Yoshizumi, R., Inoue, K., Ohtani, H., et al. (2015) Ultrafast photoreaction dynamics of a light-driven sodium-ion-pumping retinal protein from *Krokinobacter eikastus* revealed by femtosecond time-resolved absorption spectroscopy, *J. Phys. Chem. Lett.*, **6**, 4481-4486, doi: 10.1021/acs.jpcclett.5b01994.
31. Miranda, M. R., Choi, A. R., Shi, L., Bezerra, A. G. Jr., Jung, K. H., et al. (2009) The photocycle and proton translocation pathway in a cyanobacterial ion-pumping rhodopsin, *Biophys. J.*, **96**, 1471-1481, doi: 10.1016/j.bpj.2008.11.026.
32. Morizumi, T., Ou, W. L., Van Eps, N., Inoue, K., Kandori, H., et al. (2019) X-ray crystallographic structure and oligomerization of *Gloeobacter* rhodopsin, *Sci. Rep.*, **9**, 11283, doi: 10.1038/s41598-019-47445-5.
33. Bogachev, A. V., Bertsova, Y. V., Verkhovskaya, M. L., Mamedov, M. D., and Skulachev, V. P. (2016)

- Real-time kinetics of electrogenic Na⁺ transport by rhodopsin from the marine flavobacterium *Dokdonia* sp. PRO95, *Sci. Rep.*, **6**, 21397, doi: 10.1038/srep21397.
34. Nango, E., Royant, A., Kubo, M., Nakane, T., Wickstrand, C., et al. (2016) A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin, *Science*, **354**, 1552-1557, doi: 10.1126/science.aah3497.
 35. Grandjean, J., Laszlo, P., and Gerday, C. (1977) Sodium complexation by the calcium binding site of parvalbumin, *FEBS Lett.*, **81**, 376-380, doi: 10.1016/0014-5793(77)80558-9.
 36. Monoi, H. (1985) Nuclear magnetic resonance of ²³Na ions interacting with the gramicidin channel, *Biophys. J.*, **48**, 643-662, doi: 10.1016/S0006-3495(85)83820-0.
 37. Bogachev, A. V., Bertsova, Y. V., Aitio, O., Permi, P., and Verkhovsky, M. I. (2007) Redox-dependent sodium binding by the Na⁺-translocating NADH:quinone oxidoreductase from *Vibrio harveyi*, *Biochemistry*, **46**, 10186-10191, doi: 10.1021/bi700440w.
 38. Jaktetchai, O., Eberhardt, P., Asido, M., Kaur, J., Kriebel, C. N., et al. (2021) Probing the photointermediates of light-driven sodium ion pump Kr2 by DNP-enhanced solid-state NMR, *Sci. Adv.*, **7**, eabf4213, doi: 10.1126/sciadv.abf4213.
 39. Kovalev, K., Astashkin, R., Gushchin, I., Orekhov, P., Volkov, D., et al. (2020) Molecular mechanism of light-driven sodium pumping, *Nat. Commun.*, **11**, 2137, doi: 10.1038/s41467-020-16032-y.
 40. Murabe, K., Tsukamoto, T., Aizawa, T., Demura, M., and Kikukawa, T. (2020) Direct detection of the substrate uptake and release reactions of the light-driven sodium-pump rhodopsin, *J. Am. Chem. Soc.*, **142**, 16023-16030, doi: 10.1021/jacs.0c07264.
 41. Skopintsev, P., Ehrenberg, D., Weinert, T., James, D., Kar, R. K., et al. (2020) Femtosecond-to-millisecond structural changes in a light-driven sodium pump, *Nature*, **583**, 314-318, doi: 10.1038/s41586-020-2307-8.
 42. Konno, M., Kato, Y., Kato, H. E., Inoue, K., Nureki, O., Kandori, H. (2016) Mutant of a light-driven sodium ion pump can transport cesium ions, *J. Phys. Chem. Lett.*, **7**, 51-55, doi: 10.1021/acs.jpcclett.5b02385.
 43. Mamedov, A. M., Bertsova, Y. V., Anashkin, V. A., Mamedov, M. D., Baykov, A. A., et al. (2018) Identification of the key determinant of the transport promiscuity in Na⁺-translocating rhodopsins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **499**, 600-604, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.196.
 44. Kato, Y., Inoue, K., and Kandori, H. (2015b) Kinetic analysis of H⁺-Na⁺ selectivity in a light-driven Na⁺-pumping rhodopsin, *J. Phys. Chem. Lett.*, **6**, 5111-5115, doi: 10.1021/acs.jpcclett.5b02371.
 45. Nakamura, T., Kawasaki, S., and Unemoto, T. (1992) Roles of K⁺ and Na⁺ in pH homeostasis and growth of the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*, *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 1271-1276, doi: 10.1099/00221287-138-6-1271.
 46. Kandori, H., Inoue, K., and Tsunoda, S. P. (2018) Light-driven sodium-pumping rhodopsin: a new concept of active transport, *Chem. Rev.*, **118**, 10646-10658, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00548.
 47. Parsegian, A. (1969) Energy of an ion crossing a low dielectric membrane: solutions to four relevant electrostatic problems, *Nature*, **221**, 844-846, doi: 10.1038/221844a0.
 48. Mitchell, R., Mitchell, P., and Rich, P. R. (1992) Protonation states of the catalytic intermediates of cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1101**, 188-191, doi: 10.1016/0005-2728(92)90221-M.
 49. Popović, D. M., and Stuchebrukhov, A. A. (2004) Proton pumping mechanism and catalytic cycle of cytochrome *c* oxidase: coulomb pump model with kinetic gating, *FEBS Lett.*, **566**, 126-130, doi: 10.1016/j.febslet.2004.04.016.
 50. Bogachev, A. V., and Verkhovsky, M. I. (2005) Na⁺-translocating NADH:quinone oxidoreductase: progress achieved and prospects of investigations, *Biochemistry (Moscow)*, **70**, 143-149, doi: 10.1007/s10541-005-0093-4.
 51. Dracheva, S. M., Drachev, L. A., Konstantinov, A. A., Semenov, A. Yu., Skulachev, V. P., et al. (1988) Electrogenic steps in the redox reactions catalyzed by photosynthetic reaction-centre complex from *Rhodospseudomonas viridis*, *Eur. J. Biochem.*, **171**, 253-264, doi: 10.1111/j.1432-1033.
 52. Konstantinov, A. A., Siletsky, S., Mitchell, D., Kaulen, A., and Gennis, R. B. (1997) The roles of the two proton input channels in cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* probed by the effects of site-directed mutations on time-resolved electrogenic intraprotein proton transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 9085-9090, doi: 10.1073/pnas.94.17.9085.
 53. Kaulen, A. D. (2000) Electrogenic processes and protein conformational changes accompanying the bacteriorhodopsin photocycle, *Biochim. Biophys. Acta*, **1460**, 204-219, doi: 10.1016/s0005-2728(00)00140-7.
 54. Siletsky, S. A., Mamedov, M. D., Lukashev, E. P., Balashov, S. P., Dolgikh, D. A., et al. (2016) Electrogenic steps of light-driven proton transport in ESR, a retinal protein from *Exiguobacterium sibiricum*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 1741-1750, doi: 10.1016/j.bbabi.2016.08.004.
 55. Mamedov, M. D., Mamedov, A. M., Bertsova, Y. V., and Bogachev, A. V. (2016) A single mutation converts bacterial Na⁺-transporting rhodopsin into an H⁺ transporter, *FEBS Lett.*, **590**, 2827-2835, doi: 10.1002/1873-3468.12324.
 56. Grimm, C., Silapetere, A., Vogt, A., Bernal Sierra, Y. A., and Hegemann, P. (2018) Electrical properties, substrate specificity and optogenetic potential of the engineered light-driven sodium pump eKR2, *Sci. Rep.*, **8**, 9316, doi: 10.1038/s41598-018-27690-w.
 57. Inoue, K. (2021) Diversity, mechanism, and optogenetic application of light-driven ion pump rhodopsins, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1293**, 89-126, doi: 10.1007/978-981-15-8763-4_6.

MECHANISM OF ION TRANSLOCATION BY Na⁺-RHODOPSIN**Review****A. V. Bogachev***, **A. A. Baykov**, **Y. V. Bertsova**, and **M. D. Mamedov***Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia; E-mail: bogachev@belozersky.msu.ru*

This review provides a brief description of the structure and transport function of the recently discovered family of retinal-containing Na⁺-translocating rhodopsins. The main emphasis is put on the kinetics of electric potential difference generation in the membrane during a single transporter turnover. The proposed transport mechanism of Na⁺-rhodopsin posits the local electric field created by the H⁺ movement from the Schiff base as the driving force for Na⁺ capture from the cytoplasm.

Keywords: Na⁺-translocating rhodopsin, light energy conversion, retinal, ionic pump, cationic transport