Rodopsyny mikrobialne - od struktury do funkcji i adaptacji ekologicznych

STRESZCZENIE

Białka rodopsynowe występują we wszystkich trzech domenach życia, a dwa jak dotąd najlepiej poznane typy to rodopsyny zwierzęce oraz mikrobialne. Rodopsyny zwierzęce występują tylko u zwierząt, a mikrobialne u mikroorganizmów we wszystkich domenach, przy czym wśród eukariota głównie u protistów. Wszystkie znane rodopsyny posiadają podobną strukturę, złożone są z siedmiu transbłonowych α-helis oraz ligandu w postaci retinalu. Typ zwierzęcy oraz mikrobialny nie wykazują podobieństwa sekwencyjnego, co sugeruje ich konwergentną ewolucję. Rodopsyny zwierzęce odpowiadają za widzenie oraz kontrolę zegara biologicznego, natomiast rodopsyny mikrobialne za fototaksję komórek, jak również pełnią rolę pomp wodorowych lub jonowych. Procesy te mogą brać udział w przetwarzaniu energii pochodzącej od fotonów w energię wykorzystywaną przez komórkę. Zdecydowanie więcej wiemy o rodopsynach u mikroorganizmów morskich niż słodkowodnych. Różnice między tymi rodopsynami mogą być znaczące, ponieważ oba ekosystemy charakteryzują się odmiennymi warunkami środowiskowymi, które prowadzą do różnych właściwości optycznych, co w konsekwencji wpływa na sekwencje oraz strukturę rodopsyn. Celem tego artykułu jest podsumowanie aktualnego stanu wiedzy dotyczącego struktury oraz funkcji białek rodopsynowych, w szczególności rodopsyn mikrobialnych, z uwzględnieniem historii badań nad nimi i ich znaczenia w ewolucji życia na Ziemi. Jednocześnie omówione zostaną ich zastosowania biotechnologiczne oraz możliwe kierunki przyszłych badań.

mgr Małgorzata Malczewska, dr hab. Anna Karnkowska✉

Instytut Biologii Ewolucyjnej, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

https://doi.org/10.18388/pb.2021_638

✉Autor korespondencyjny: a.karnkowska@uw.edu.pl

Słowa kluczowe: archeony, bakterie, horyzontalny transfer genów, rodopsyny mikrobialne, opsyny, protisty

Podziękowania: Praca powstała w ramach realizacji projektu badawczego EMBO Installation Grant Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Europejskiej Organizacji Biologii Molekularnej (grant numer 4150). Ryciny oraz streszczenie graficzne zostały przygotowane przy użyciu oprogramowania BioRender.

HISTORIA BADAŃ RODOPSYN

W toku ewolucji powstało u człowieka pięć rozwiniętych zmysłów, dzięki którym pojmujemy i poznajemy świat, a dominującym dla nas zmysłem jest wzrok [1], który pozwala nam wyłapywać określone długości fal elektromagnetycznych i przy pomocy układu nerwowego przekształcać je w obrazy. Jednej z pierwszych rewolucji w badaniach tego tematu dokonał w roku 1851 Heinrich Müller [2], kiedy to opublikował pracę, w której opisał występowanie w siatkówce oka żaby, układu włókien łączących pręciki i czopki z nerwem optycznym. Pozwalało to przypuszczać, że te dwa typy komórek biorą udział w widzeniu. Świat nauki nie przyjął jego wniosków przychylnie, ponieważ kierując się zasadami fizyki nikt nie przypuszczał, że bezbarwne komórki są w stanie absorbować fale w zakresie widzialnym. Pierwotnie pominięty jednak został znaczący fragment pracy Müllera, w którym autor opisał czerwonawy kolor ułożonych ściśle obok siebie pręcików w siatkówce oka żaby.

Kolejnym ważnym krokiem w historii badań nad pigmentami wzrokowymi była praca Franza Christiana Bolla z roku 1877 [3]. Badacz zaobserwował, że siatkówka oka żaby trzymanej w ciemności nabiera koloru czerwonego, który traci stopniowo intensywność po wystawieniu na światło dzienne, aż do pełnego zaniku. Ważnym spostrzeżeniem było to, że po odcięciu dostępu do światła kolor powraca. W swojej pracy Boll pomylił się jednak co do powiązania występowania właściwości światłoczułych siatkówki z żywotnością żaby. Kolejne badania pokazały, że siatkówka, nawet po wycięciu z organizmu, jeśli była poprawnie przechowywana, mogła zachować właściwości światłoczułe. Oznaczało to, że procesy które w niej zachodzą mają podstawy chemiczne niezależne od funkcjonowania całego organizmu.

Od tych odkryć minęło ponad 150 lat, a w międzyczasie zrozumiano biochemiczne i biofizyczne podstawy działania pigmentów wzrokowych. Odkryto, że są złożone z chromoforu - retinalu, który absorbuje foton światła o określonej długości fali oraz związanego z nim białka - opsyny. Udało się również wyróżnić ich typy: od jodopsyn występujących w czopkach i odpowiadających za kolorowe widzenie dzienne, przez rodopsyny pojawiające się w pręcikach i umożliwiające widzenie zmierzchowe, aż po melanopsyny, które działają niezależnie od pozostałych i odpowiadają za ustalenie rytmu dobowego. Dopiero w 1971 roku dokonano odkrycia rodopsyn u jednokomórkowych organizmów prokariotycznych, a konkretnie w archeonie *Halobacterium halobium* [4], inaczej nazy-

wanym *Halobacterium salinarium*. Był to pierwszy raz kiedy rodopsyny, wcześniej znane tylko u zwierząt, odnaleziono u jednego z przedstawicieli mikroorganizmów. Doprowadziło nas to do pytania co łączy siatkówkę oka kręgowców z błoną halofilnego archeona?

RODOPSYNY A EWOLUCJA ŻYCIA NA ZIEMI

Aby poznać odpowiedź na to pytanie musimy zrozumieć miejsce rodopsyn w ewolucji życia na Ziemi. Z biegiem lat zrozumiano, że nie wszystkie rodopsyny pełnią funkcje sensoryczne. Te, które odnaleziono u *H. salinarium* odpowiadały za przetwarzanie energii słonecznej w energię wykorzystywaną przez komórki pod postacią ATP (tzw. fototrofia rodopsynowa). W przyrodzie występują inne systemy, oparte głównie na chlorofilu, które umożliwiają takie działanie. Przewagą rodopsyn jest ich prostota i co za tym idzie niższy koszt niż fotosystemów opartych na chlorofilu i występujących w chloroplastach. Aby sprawnie działać systemy rodopsynowe wymagają obecności tylko jednego białka - opsyny oraz jednego chromoforu - retinalu. Ponadto często wystarczy zmiana pojedynczego aminokwasu w sekwencji rodopsyny, aby zaczęła ona pełnić odmienną funkcję [5] lub zmieniła swój zakres absorpcji światła [6]. Połączenie tej plastyczności oraz prostoty w ich budowie doprowadziło do tego, że białka rodopsynowe możemy znaleźć w większości środowisk występujących na Ziemi, od otwartych powierzchni lądowych, aż po środowiska wodne. Co więcej, dzięki swojej prostocie w wielu środowiskach zdominowały one proces przetwarzania energii słonecznej na ATP [7].

Wyniki dotychczasowych badań wskazują na to, że powszechność występowania rodopsyn oraz wachlarz pełnionych przez nie funkcji są wynikiem ich bardzo wczesnego pojawienia się w ewolucji życia na Ziemi [8]. Nie jest jednak pewne czy nastąpiło to przed, czy po katastrofie tlenowej (ang. *Great Oxidation Event*), w trakcie której drastycznie wzrósł poziom tlenu w atmosferze ziemskiej Z zasady synteza retinalu w organizmie wymaga występowania w nim również tlenu, istnieją jednak badania sugerujące, że organizmy opierające swoje funkcjonowanie na fototrofii rodopsynowej są w stanie przetrwać w warunkach niedotlenienia [9] oraz że mogą istnieć alternatywne drogi biosyntezy retinalu, których jeszcze nie poznaliśmy [10]. Ciekawym aspektem rozważań na temat rodopsyn i ich wpływu na powstanie, ewolucję oraz rozprzestrzenienie życia na Ziemi jest tworzenie teoretycznych modeli możliwego powstania i rozwoju życia poza naszą planetą [8]. Rozważania te prowadzą do wniosku, że białka dzięki którym postrzegamy teraz otaczający nas świat mogły powstać nawet 2,4 miliarda lat temu, czyli przed Wielką Katastrofą Oksydacyjną.

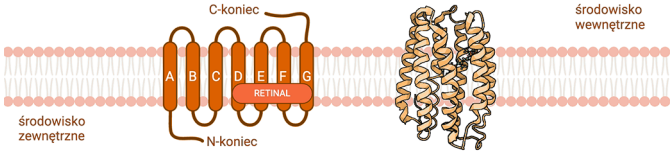
STRUKTURA BIAŁEK RODOPSYNOWYCH

Rodopsyny występują we wszystkich trzech domenach życia, a także u wirusów, gdzie pełnią zróżnicowane funkcje biologiczne. Choć strukturalnie wszystkie są do siebie podobne, to pojawiają się między nimi pewne różnice, które umożliwiły wprowadzenie ich podziału na trzy typy:

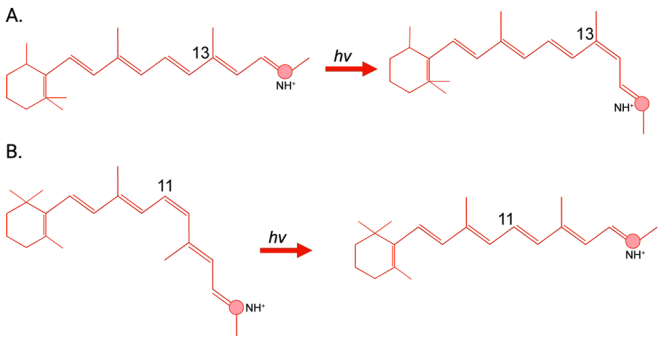
- typ I - rodopsyny mikrobialne odpowiedzialne za przemianę energii oraz inicjację sygnalizacji wewnątrz- oraz międzykomórkowej; występują u bakterii, archeonów, protistów, a także u wirusów,
- typ II - rodopsyny zwierzęce, które biorą udział w fototransdukcji wzrokowej (widzenie) i niewzrokowej (regulacja rytmu dobowego); ich występowanie ogranicza się tylko do zwierząt,
- typ III - stosunkowo niedawno odkryty typ [4], nazywany heliorodopsynami, którego funkcje nie zostały jeszcze dokładnie poznane; podobnie jak typ I występuje u mikroorganizmów.

Niezależnie o którym typie rodopsyn mówimy, każdy z nich charakteryzuje się strukturą utworzoną z siedmiu transbłonowych α-helis. U rodopsyn typu I oraz typu II N--koniec białka skierowany jest na zewnątrz komórki, a koniec C do jej wnętrza (Ryc.1). Rodopsyny typu III posiadają analogiczną budowę, są jednak osadzone w błonie odwrotnie. Ich N koniec skierowany jest do wnętrza komórki, a C koniec na jej zewnątrz.

Ewolucyjnie rodopsyny typu I oraz typu II zdają się być bardzo odległe od siebie i ewentualnego wspólnego przodka, albo wręcz powstały niezależnie [11]. Łączy je struktura i mechanizm działania, ale nie są homologami. Mimo dużego podobieństwa strukturalnego ich sekwencje aminokwasowe nie wykazują dużego poziomu podobieństwa, co sugeruje ewolucję konwergentną (w tym wypadku, niezależne wykształcenie podobnej struktury lub funkcji białek o odmiennym pochodzeniu ewolucyjnym). Możliwość konwergentnej ewolucji rodopsyn typu I oraz typu II nie jest jedynym intrygującym aspektem w tej historii. Mikrobialne rodopsyny typu I występują we wszystkich trzech domenach, jednak o ile ich występowanie u bakterii i archeonów można uznać za częste lub nawet powszechne, to u organizmów eukariotycznych ogranicza się ono głównie do jednokomórkowych protistów. Ponadto możemy je również napotkać u niektórych wirusów. Badania nad występowaniem rodopsyn typu I u tzw. wirusów olbrzymich (ang. *giant viruses*) pozwoliło stwierdzić, że najprawdopodobniej to one umożliwiły horyzontalny transfer genów kodujących rodopsyny między prokariontami i protistami [7]. Tłumaczy to dlaczego mimo występowania dużego podobieństwa niektóre grupy rodopsyn nie tworzą jednej linii ewolucyjnej, a są rozproszone pomiędzy gatunkami odległymi od siebie ewolucyjnie. Te same badania sugerują, że nowo odkryty typ III rodopsyn - heliorodopsyny - jest ze względu na jego występowanie tylko wśród organizmów



Rycina 1. Schemat struktury przykładowego białka rodopsynowego oraz jego ułożenia w błonie. Po lewej stronie schematyczna struktura budowy oraz ustawienia w błonie rodopsyny typu I lub typu II (literami A-G oznaczono kolejne helisy białka), po prawej wizualizacja układu siedmiu α-helis względem siebie otaczających chromofor.



Rycina 2. Schemat zmian konformacyjnych retinalu pod wpływem zaabsorbowania fotonu światła u rodopsyn mikrobialnych oraz zwierzęcych. A - przejście retinalu z formy podstawowej do wzbudzonej dla rodopsyn mikrobialnych; B - przejście retinalu z formy podstawowej do wzbudzonej dla rodopsyn zwierzęcych.

tworzących wspólną linię ewolucyjną młodszy od typu I. Można przypuszczać, że w przypadku tych rodopsyn również nastąpił horyzontalny transfer genów przy pomocy wirusów, jednak tym razem od organizmów eukariotycznych do prokariotycznych [8].

Oprócz trzech wcześniej wymienionych podstawowych typów rodopsyn, niedawno został odkryty jeszcze jeden nowy typ - Schizorodopsyny. Zostały one opisane u archeonów z grupy Asgard, które są najbliżej spokrewnionymi z eukaryota organizmami prokariotycznymi. Schizorodopsyny pełnią u archeonów Asgard funkcję pomp protonowych, a filogenetycznie zdają się być umiejscowione między rodopsynami typu I a heliorodopsynami [9].

RETINAL

Rodopsyny to jednak nie tylko białko i jego struktura. Centrum funkcjonowania każdej rodopsyny jest retinal i przestrzeń wokół niego - to właśnie ona definiuje zakres absorpcji całego białka, a czasem nawet to jaką ma ono pełnić funkcję.

Retinal będący chromoforem rodopsyn (i opsyn innego typu) jest aldehydem witaminy A uzyskanym z β-karotenu. Jest on związany z rodopsynami poprzez zasadę Schiffa, która łączy go z ε-aminową grupą lizyny znajdującej się w środku siódmej (G) α-helisy. Zasada Schiffa w większości przypadków jest uprotonowana (RSBH+), jednak oscylacja między tym stanem a formą podstawową (RSB) często odgrywa ważną rolę w funkcjonowaniu rodopsyn. W zależności od tego z jaką rodopsyną mamy do czynienia, będzie on występował w różnych formach.

U mikrobialnych rodopsyn typu I podstawowa forma retinalu przybiera postać pełnej izomerii *trans*. W momencie zaabsorbowania fotonu światła retinal przekształca się w formę izomeryczną 13-*cis*. U rodopsyn zwierzęcych mamy odwrotną sytuację: forma podstawowa retinalu to forma z występującą izomerią *cis*, choć nie przy węglu 13 lecz 11 (forma 11-*cis*). Dopiero po zaabsorbowaniu fotonu przybiera on w pełni formę *trans*. Na Rycinie 2 schematycznie przedstawiono przejścia retinalu z formy podstawowej do wzbudzonej.

STROJENIE KOLORU (ang. *COLOR TUNING*)

Rodopsyny poniekąd zostały odkryte dzięki temu, że posiadają kolor, który jest związany z ich podstawową funkcją - absorpcją światła widzialnego. Okazuje się, że wpływ na zakres absorpcji rodopsyny może mieć kilka czynników, które nakładają się ze sobą. Czynniki te możemy podzielić na te związane ze strukturą rodopsyny oraz te wynikające z układu wiązań w retinalu.

Struktura rodopsyny wpływa na długość absorbowanych przez retinal fal poprzez modelowanie wokół niego środowiska. Możemy tutaj wymienić czynniki takie jak interakcje retinalu z naładowanymi, polarnymi lub aromatycznymi aminokwasami, które wpływają na zmianę poziomów energii elektronowej, interakcje z wiązaniami wodorowymi lub efekty wynikające z kontaktów sterycznych.

Największy wpływ zdają się mieć tutaj interakcje z przeciwjonami znajdującymi się w pobliżu miejsca wiązania retinalu. Obecność negatywnie naładowanych aminokwasów w pobliżu $RSBH^+$ powoduje przesunięcie maksimum absorpcji w stronę światła niebieskiego. Jest to spowodowane stabilizacją podstawowego stanu elektronowego retinalu, czyli jego formy przed absorpcją fotonu, poprzez oddziaływania elektrostatyczne między obydwoma ładunkami. Stabilizacja ta zmniejsza energię stanu podstawowego, równocześnie zwiększając różnicę energii między tym stanem a stanem wzbudzonym. Prowadzi to do potrzeby zaabsorbowania fotonu charakteryzującego się krótszą falą i większą energią. Odwrotny efekt daje obecność ładunku ujemnego w pobliżu pierścienia β-jononu. W stanie wzbudzonym ładunek dodatni zostaje przesunięty z zasady Shiffa na pierścień β-jononu, a obecność ładunku ujemnego przy nim prowadzi tym razem do stabilizacji stanu wzbudzonego poprzez oddziaływania elektrostatyczne. Obniżenie energii stanu wzbudzonego zmniejsza jednocześnie różnicę energii między nim a stanem podstawowym, a więc następuje przesunięcie maksimum absorpcji w stronę światła czerwonego, czyli fotonów o dłuższych długościach fal. W rodopsynach zwierzęcych oraz mikrobialnych występuje głównie układ negatywnego ładunku w pobliżu uprotonowanej zasady Schiffa.

W kontekście układu wiązań retinalu, największy wpływ na absorpcję zdaje się mieć izomeria wiązania pomiędzy węglem szóstym a siódmym, która również odróżnia rodopsyny zwierzęce od mikrobialnych. W rodopsynach zwierzęcych wiązanie to występuje w formie 6-*s*-*cis*, co sprawia, że łańcuch polienowy oraz β-jonon nie są płaskie. To powoduje, że sprzężenie π-elektronów nie rozciąga się na pierścień β-jononu tak wydajnie. W rodopsynach mikrobialnych mamy natomiast do czynienia z izomerią 6-*s*-*trans*, co ułatwia rozpostarcie sprzężenia π-elektronów na pierścień β-jononu. Skutkiem tego są odmienne zakresy absorpcji dla tych dwóch typów rodopsyn. Rodopsyny zwierzęce absorbują głównie w zakresie 480-525 nm (kolory niebieskie i zielone), podczas gdy rodopsyny mikrobialne absorbują przeważnie w zakresie 520-580 nm (kolory zielone i żółte) [12]. Zarówno ładunek przy zasadzie Shiffa lub β-jononie, jak i izomeria wiązania pomiędzy węglem szóstym a siódmym mogą nakładać się na siebie, przez co stworzenie

systemu obliczeniowego pozwalającego na przewidywanie zakresów absorpcji danej rodopsyny jest dalej dla nas wyzwaniem.

Badania potwierdzają, że zmiana pojedynczego aminokwasu może wpłynąć na właściwości absorpcyjne rodopsyn. Przykładem może być tutaj różnica w działaniu dwóch rodzajów proteorodopsyn - zielonych i niebieskich. Badania wykazały, że wpływ na różnice w ich zakresach absorpcji ma aminokwas znajdujący się na 105 pozycji. W przypadku proteorodopsyn absorbujących w zielonym świetle na tym miejscu znajduje się niepolarna leucyna, natomiast w sekwencjach proteorodopsyn absorbujących w niebieskim świetle występuje polarna glutamina [6]. Na tych przykładach widać, że nawet najdrobniejszy element budowy białka może wpływać na jego właściwości. Różnorodność rodopsyn nie ogranicza się jednak jedynie do zakresu absorpcji światła, ale również pełnionych przez nie funkcji.

Tabela 1. Systematyzacja rodzajów rodopsyn mikrobialnych według ich funkcji oraz przynależności do wyróżnianych klastrów filogenetycznych wraz z uwzględnieniem domeny, w której występują; w oparciu o opracowanie Pinhassi i wsp. 2016 [13].

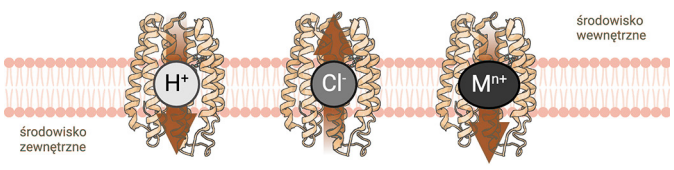
	KLASTER A		KLASTER B	
	Nazwa typu rodopsyny	Główna domena występowania	Nazwa typu rodopsyny	Główna domena występowania
Pompy protonowe	bakteriorodopsyny	archeony	ksantorodopsyny	bakterie
	proteorodopsyny	archeony	proteorodopsyny	bakterie, archeony
Pompy jonowe	halorodopsyny	archeony	pompy sodowe	bakterie
	rodopsyny kanałowe	mikroorganizmy eukariotyczne	pompy chlorowe	bakterie
Rodopsyny sensoryczne	typ I, typ II, typ III	archeony	-	-
	rodopsyny enzymatyczne	mikroorganizmy eukariotyczne	-	-

RÓŻNORODNOŚĆ RODOPSYN MIKROBIALNYCH

FUNKCJE RODOPSYN TYPU I

Rodopsyny mogą pełnić różnorodne funkcje w komórkach. Choć najbardziej oczywista zdaje się być funkcja sensoryczna, która jest główną funkcją rodopsyn typu II, to w przypadku typu I mamy do czynienia z większą różnorodnością. Możemy spotkać zarówno białka sensoryczne, jak i pompy protonowe lub kanały jonowe. Na Rycinie 3 przedstawiono kierunki transportu jonów przez pompy rodopsynowe.

Filogenetycznie możemy wyróżnić dwie główne grupy rodopsyn mikrobialnych. Klaster A zawiera w sobie głównie sekwencje archeonowe oraz eukariotyczne wraz z kilkoma sekwencjami bakteryjnymi, a klaster B w większości zawiera sekwencje bakteryjne z dodatkiem sekwencji archeonowych i eukariotycznych. Obecność w tych klastrach "niepasujących" sekwencji z innych linii ewolucyjnych najpewniej jest wynikiem horyzontalnego transferu genów między domenami życia. Taki podział rodopsyn, oparty o filogenezę, odzwierciedla aktualnie przyjęte spojrzenie na ewolucję domen życia. Sugeruje to, że najstarsze rodopsyny są starsze niż rozejście się bakterii i archeonów, a zatem "antyczna" rodopsyna została odziedziczona przez dwie nowo powstające domeny, a następnie w drodze horyzontalnego transferu genów została przeniesiona do organizmów eukariotycznych.



Rycina 3. Schematyczne przedstawienie kierunku działania pomp rodopsynowych.

W każdym z tych dwóch klastrów możemy wyróżnić kolejne podziały na mniejsze klastry odzwierciedlające pełnione przez dane rodopsyny funkcje [13] (Tabela 1).

POMPY PROTONOWE

Wśród znanych rodopsyn najwięcej z nich pełni funkcje pomp protonowych. Pod wpływem absorpcji światła doprowadzają one do przemieszczenia protonu przez błonę, w której są zakotwiczone. Skutkuje to powstaniem gradientu elektrochemicznego wokół membrany, dzięki czemu może zajść transport aktywny lub synteza ATP. Nie jest nadal pewne czy któraś z tych funkcji jest faworyzowana [14].

W klastrze A do tej grupy zalicza się baktriorodopsyny. To właśnie jedno z tych białek było pierwszą poznaną rodopsyną pochodzącą z *H. salinarium*. W klastrze B dominują natomiast proteorodopsyny, które występują w proteobakteriach oraz w Bacteroidetes. Zaobserwowano także obecność ksantorodopsyn (ang. *xanthorhodopsins*), czyli rodopsynowych pomp protonowych wyposażonych w dodatkowy chromofor – karotenoid saliniksantynę (ang. *salinixanthin*). Chromofor pełni funkcję anteny pigmentowej, umożliwiając poszerzenie zakresu fal świetlnych absorbowanych przez białko.

POMPY JONOWE

Odpowiadają one za pompowanie jonów przez błonę. Aniony pompowane są do środka, a kationy na zewnątrz. Białka te są często odnajdywane w organizmach żyjących w dużym zasoleniu, ponieważ pomagają one w utrzymaniu odpowiedniego ciśnienia osmotycznego jak i przetwarzaniu energii poprzez wytwarzanie chemiosmotycznego potencjału na błonie. Istnieją prace eksperymentalne potwierdzające, że mutacja pojedynczego aminokwasu w baketriorodopsynach, zmiana kwasu asparaginowego na miejscu 85 na treoninę, doprowadziła do przekształcenia heterologicz-

nie eksprymowanego w *H. salinarium* Pho81 białka z pompy protonowej na pompę chlorową [5].

W klastrze A możemy wyróżnić dwa odległe od siebie rodzaje tych pomp. Pierwszy z nich to halorodopsyny, które występują tylko u archeonów, choć odnaleziono gen homologiczny u bakterii. Drugi rodzaj to rodopsyny kanałowe, występujące w komórkach eukariotycznych (zielenice oraz kryptofity), które pod wpływem światła umożliwiają przepływ jonów. W klastrze B mamy natomiast do czynienia z pompami sodowymi, które wykryto u Bacteroidetes i Deinococcus-Thermus oraz z pompami chlorowymi, do tej pory odkrytymi tylko u alfaproteobakterii i Bacteroidetes.

RODOPSYNY SENSORYCZNE

Część rodopsyn mikrobialnych odpowiada za fototaksję organizmów, a mechanizm ich działania różni się od tych pełniących funkcje wymienionych powyżej pomp. Rodopsyny sensoryczne charakteryzują się tworzeniem produktów pośrednich o długim czasie półtrwania (~800 ms), podczas gdy te wytwarzane przez rodopsynowe pompy jonowe istnieją do ~10 ms. Tak długi okres półtrwania produktów pośrednich pozwala na funkcjonowanie tych białek na zasadzie "*jeden foton - pobudzenie, drugi foton - wyciszenie*". Ten sposób działania umożliwia komórce rozpoznanie i kierowanie się w stronę źródła światła o większych długościach fali, czyli takich które mogą posłużyć w procesach fotoenergetycznych, a unikanie przestrzeni, w których występuje światło o wysokiej energii, np. UV [15]. Białka te zazwyczaj pojawiają się w połączeniu z białkami z rodziny HtrI lub HtrII, które biorą udział w ich ścieżce sygnałowej [16].

Występują one tylko w klastrze A. Wśród archeonów możemy wyróżnić ich trzy typy:

- typ I (SRI) - umożliwia kierowanie się organizmu w stronę światła,
- typ II (SRII) - umożliwia ucieczkę od szkodliwego światła, czasem nazywane są foborodopsynami (ang. *phoborhodopsins*) i do tej pory odkryto je tylko u haloarcheonów. Badania wskazują na częstsze występowanie SRII w warunkach o wysokim stężeniu tlenu oraz na ich możliwości pełnienia funkcji pomp protonowych o ile nie występują w połączeniu z białkiem HtrII [17],
- typ III (SRIII) - jest to typ odkryty jak dotąd tylko u *Haloarcula marismortui*, który wyróżnia się budową oraz funkcjonowaniem - nie powoduje u komórki fototaksji, a ze względu na obecność tylko dodatkowej domeny HAMP najpewniej może brać udział w interakcjach białko-białko.

Wymienione powyżej rodopsyny sensoryczne nie występują u komórek eukariotycznych, u których zamiast tego występują tzw. rodopsyny enzymatyczne charakteryzujące się bardziej złożoną budową. Białka te posiadają na N-końcu charakterystyczną domenę rodopsynową, natomiast na C-końcu pojawiają się domeny kinaz histydynowych i regulatorów odpowiedzi oraz cyklaz adenylowych/guanylowcyh i fosfodiestraz [18].

RODOPSYNY W BIOTECHNOLOGII

Zbadanie różnorodności i funkcji rodopsyn mikrobialnych pozwoliło na ich biotechnologiczne wykorzystanie. Okazało się bowiem, że systemy umożliwiające manipulację otoczeniem lub wywoływanie w nim konkretnych reakcji pod wpływem impulsów świetlnych mogą znaleźć zastosowanie w wielu dziedzinach, od biologii syntetycznej po medycynę. Z jednej strony coraz częściej bada się możliwość wykorzystania rodopsyn w systemach syntetycznych służących choćby do przechowywania danych lub w systemach mających na celu przetwarzanie światła słonecznego w energię użytkową [19]. Z drugiej strony rodopsyny otworzyły drzwi do jednej z najbardziej zaawansowanych technik medycznych. Pewien specyficzny typ rodopsyn kanałowych, pochodzący z zielenic, wykorzystano poprzez jego heterologiczną ekspresję w komórkach zwierzęcych. W warunkach natywnych wyzwala on fototaksję komórki po zaabsorbowaniu fotonu i otwarciu kanału jonowego, który jest jego częścią. Po ekspresji w komórkach nerwowych białka te zostają wbudowane w błonę komórkową, co później umożliwia nam pobudzanie komórek przez sygnały świetlne. Odkrycie to pozwoliło na stworzenie całej nowej dziedziny nazywanej optogenetyką, która między innymi umożliwiła rozwój badań nad układem nerwowym [20] oraz nad metodami przywracania wzroku u osób z chorobami degeneracyjnymi siatkówki [21]. Choć obecnie w optogenetyce najczęściej wykorzystuje się rodopsyny kanałowe, które pobudzają działanie neuronów, to zaczynamy też wykorzystywać Halorodopsyny, pochodzące z mikroorganizmów prokariotycznych, które pozwalają na wyciszanie tych neuronów.

Mnogość możliwych zastosowań rodopsyn w biologii syntetycznej czy medycynie jest ogromna, naturalna jest więc potrzeba rozszerzenia naszej wiedzy na ich temat. Prowadzi to do chęci poznania oraz zbadania jak największej liczby rodopsyn, szczególnie tych kanałowych pochodzących z mikroorganizmów eukariotycznych i występujących w różnych środowiskach, ponieważ mogą posiadać unikalne cechy lub funkcje.

WYSTĘPOWANIE EUKARIOTYCZNYCH RODOPSYN MIKROBIALNYCH

ŚRODOWISKO MORSKIE

Wielkoskalowe badania różnorodności genetycznej mikroorganizmów w środowiskach morskich, takie jak projekt *Tara Oceans*, umożliwiło dokładniejsze zrozumienie funkcjonowania organizmów z ekosystemów morskich również pod kątem występowania i działania w nich rodopsyn [22]. Na podstawie zebranych danych metatranskryptomowych podjęto próbę utworzenia oceanicznego atlasu genów eukariotycznych [23]. Powstały w ten sposób katalog pozwolił stworzyć narzędzie do badania funkcji genów eksprymowanych przez mikroorganizmy eukariotyczne w oceanach, a także umożliwił rozpoczęcie globalnych badań nad ich funkcjonalną biogeografią. W trakcie wspomnianych badań analizowano również dane dotyczące białek rodopsynowych. Wykazały one, że znacząca większość transkryptów zawierających sekwencje rodopsynowe pochodziła od organizmów z grupy Alveolata, w tym bruzdnic. Potwierdziły

także, że systemy rodopsynowe nie są głównym, a drugorzędnym sposobem pozyskiwania energii przez eukariotyczne organizmy fototroficzne. Dokonano także podziału funkcjonalnego zidentyfikowanych rodopsyn mikrobialnych. Największy klaster odpowiadał proteorodopsynom, trzeci zawierał w sobie rodopsyny sensoryczne. Drugi co do wielkości zawierał najmniejszą liczbę sekwencji referencyjnych, przez co trudno było przypisać do niego konkretną funkcję, choć zawierały one konserwowane sekwencje związane z rodopsynowymi pompami protonowymi. Wyniki tych badań pokazują, że bioinformatyczna analiza globalnych danych umożliwia odkrycie nowych typów białek, które choć stanowią znaczącą część całej swojej rodziny to nie zostały do tej pory opisane ze względu na brak możliwości hodowli laboratoryjnej organizmów, u których występują.

JEZIORA SŁODKOWODNE

Środowiska wód słonych i słodkowodnych są zróżnicowane w kontekście właściwości fizykochemicznych, jak i optycznych. Ze względu na rozbieżność w składzie chemicznym i organicznym w zbiornikach wodnych różnego typu będzie przenikać światło w innym zakresie. Otwarte przestrzenie oceanów oraz jeziora oligotroficzne najlepiej przepuszczają światło niebieskie i zielone. Przybrzeżne wody oceanów oraz jeziora eutroficzne umożliwiają przenikanie najgłębiej światłu zielonemu oraz żółtemu. Najbardziej charakterystyczne w kontekście przepuszczalności światła są natomiast jeziora dystroficzne. Ten typ zbiorników słodkowodnych jest bogaty w kwasy humusowe, co znacząco obniża jego pH oraz ubogi w pozostałe związki organiczne. Skutkuje to nie tylko charakterystyczną, choć skromną bioróżnorodnością, ale także specyficznym odcieniem wody. Zabarwienie tego typu jezior wynika z tego, że najgłębiej przenikają fale światła odpowiadające kolorom czerwonemu oraz żółtemu.

Ze względu na wymienione powyżej różnice w przepuszczalności danych zakresów światła można przypuszczać, że organizmy występujące w wodach słodkich mogą mieć odmienne białka rodopsynowe niż organizmy występujące w wodach słonych. Dzięki projektom takim jak *Tara Oceans* wiemy zdecydowanie więcej o różnorodności rodopsyn eukariotycznych w środowiskach morskich. Dla środowisk słodkowodnych mamy dostęp do skromnej bazy danych StratFreshDB [24] zawierającej dane metagenomiczne z 41 jezior słodkowodnych. Jest to bardzo mała baza, zważywszy że tylko w Polsce jest ponad 9 tysięcy jezior. Jeziora słodkowodne są ciekawym ekosystemem do badań nad rodopsynami w celu odkrycia i klasyfikacji nowych typów tych białek, a także porównania ich sekwencji, funkcji oraz zakresu absorpcji ze znanymi nam już rodopsynami słonowodnymi. W ostatnich latach zaczęły pojawiać się w tym temacie badania oparte głównie o sekwencjonowanie wysokoprzepustowe całych zbiorowisk mikroorganizmów jeziornych jednak skupiały się one głównie na organizmach prokariotycznych [23]. Poznanie rodopsyn eukariotycznych w środowiskach słodkowodnych może umożliwić nam zarówno lepsze zrozumienie ich ewolucji, jak również odkrycie białek o nowych cechach, które mogą być wykorzystane w biotechnologii.

PODSUMOWANIE

Rodopsyny wyewoluowały co najmniej 2,3 miliarda lat temu, jako białka zdolne do przetwarzania energii słonecznej w ATP. W toku ewolucji doszło do ich dalszego różnicowania strukturalnego i funkcjonalnego. Choć ich główne funkcje pozostają metaboliczne i sensoryczne, realizują je na wyjątkowo różnorodne sposoby. Istnieją też przesłanki, że rodopsyny występujące u zwierząt i bardzo liczna grupa rodopsyn mikrobialnych powstały niezależnie od siebie Rodopsyny mikrobialne, występują powszechnie u różnych grup mikroorganizmów, zarówno prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Ich różnorodność wynika również z różnorodności środowisk, w których pełnią swoje funkcje co powoduje, że mają różne maksimum absorpcji światła. Potencjał aplikacyjny rodopsyn mikrobialnych zarówno w biotechnologii medycznej, jak i w rozwijających się technologiach opartych na świetle bierze się właśnie z ich zdolności odpowiedzi na różne długości fal świetlnych. Aby w pełni zrozumieć ewolucję i potencjał aplikacyjny tych białek, konieczne jest zatem dalsze identyfikowanie i charakteryzowanie nowych typów rodopsyn, zwłaszcza tych występujących u mikroorganizmów pochodzących ze słabiej poznanych środowisk.

PIŚMIENNICTWO

1. Witten IB, Knudsen EI (2005) Why Seeing Is Believing: Merging Auditory and Visual Worlds. Neuron 48: 489–496
2. Müller H (1851) Zur histologie der netzhaut. Z Wiss Zool 3: 234–237
3. Boll F (1877) Zur anatomie und physiologie der retina. Arch Anat Physiol 4: 783–787
4. Stoeckenius W, Oesterhelt D (1971) Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of Halobacterium halobium. Nature New Biol 233: 149–152
5. Sasaki J, Brown LS, Chon Y-S, Kandori H, Maeda A, Needleman R, Lanyi JK (1995) Conversion of Bacteriorhodopsin into a Chloride Ion Pump. Science 269: 73–75
6. Man D (2003) Diversification and spectral tuning in marine proteorhodopsins. EMBO J 22: 1725–1731
7. Gómez-Consarnau L, Raven JA, Levine NM, Cutter LS, Wang D, Seegers B, Arístegui J, Fuhrman JA, Gasol JM, Sañudo-Wilhelmy SA (2019) Microbial rhodopsins are major contributors to the solar energy captured in the sea. Sci Adv 5: eaaw8855
8. Sephus CD, Fer E, Garcia AK, Adam ZR, Schwieterman EW, Kacar B (2022) Earliest Photic Zone Niches Probed by Ancestral Microbial Rhodopsins. Mol Biol Evol 39: msac100
9. DasSarma P, Zamora RC, Müller JA, DasSarma S (2012) Genome-Wide Responses of the Model Archaeon Halobacterium sp. Strain NRC-1 to Oxygen Limitation. J Bacteriol 194: 5530–5537
10. Nakajima Y, Kojima K, Kashiyama Y, Doi S, Nakai R, Sudo Y, Kogure K, Yoshizawa S (2020) Bacterium Lacking a Known Gene for Retinal Biosynthesis Constructs Functional Rhodopsins. Microbes Environ 35: ME20085
11. Kojima K, Sudo Y (2023) Convergent evolution of animal and microbial rhodopsins. RSC Adv 13: 5367–5381
12. Ernst OP, Lodowski DT, Elstner M, Hegemann P, Brown LS, Kandori H (2014) Microbial and Animal Rhodopsins: Structures, Functions, and Molecular Mechanisms. Chem Rev 114: 126–163
13. Pinhassi J, DeLong EF, Béjà O, González JM, Pedrós-Alió C (2016) Marine Bacterial and Archaeal Ion-Pumping Rhodopsins: Genetic Diversity, Physiology, and Ecology. Microbiol Mol Biol Rev 80: 929–954
14. Béjà O, Aravind L, Koonin EV, Suzuki MT, Hadd A, Nguyen LP, Jovanovich SB, Gates CM, Feldman RA, Spudich JL, Spudich EN,

DeLong EF (2000) Bacterial Rhodopsin: Evidence for a New Type of Phototrophy in the Sea. Science 289: 1902–1906

15. Spudich JL, Bogomolni RA (1984) Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin. Nature 312: 509–513
16. Yao VJ, Spudich JL (1992) Primary structure of an archaebacterial transducer, a methyl-accepting protein associated with sensory rhodopsin I. Proc Natl Acad Sci 89: 11915–11919
17. Spudich J (1994) Protein-protein interaction converts a proton pump into a sensory receptor. Cell 79: 747–750
18. Govorunova EG, Sineshchekov OA, Li H, Spudich JL (2017) Microbial Rhodopsins: Diversity, Mechanisms, and Optogenetic Applications. Annu Rev Biochem 86: 845–872
19. Tu W, Saeed H, Huang WE (2024) Rhodopsin-based light-harvesting system for sustainable synthetic biology. Microb Biotechnol 17: e14521
20. Chen W, Li C, Liang W, Li Y, Zou Z, Xie Y, Liao Y, Yu L, Lin Q, Huang M, Li Z, Zhu X (2022) The Roles of Optogenetics and Technology in Neurobiology: A Review. Front Aging Neurosci 14: 867863
21. Poboży K, Poboży T, Domański P, Derczyński M, Konarski W, Domańska-Poboża J (2025) Evolution of Light-Sensitive Proteins in Optogenetic Approaches for Vision Restoration: A Comprehensive Review. Biomedicines 13: 429
22. Pesant S, Not F, Picheral M, Kandels-Lewis S, Le Bescot N, Gorsky G, Iudicone D, Karsenti E, Speich S, Troublé R, Dimier C, Searson S, Tara Oceans Consortium Coordinators, Acinas SG, Bork P, Boss E, Bowler C, De Vargas C, Follows M, Gorsky G, Grimsley N, Hingamp P, Iudicone D, Jaillon O, Kandels-Lewis S, Karp-Boss L, Karsenti E, Krzic U, Not F, Ogata H, Pesant S, Raes J, Reynaud EG, Sardet C, Sieracki M, Speich S, Stemmann L, Sullivan MB, Sunagawa S, Velayoudon D, Weissenbach J, Wincker P (2015) Open science resources for the discovery and analysis of Tara Oceans data. Sci Data 2: 150023
23. Carradec Q, Pelletier E, Da Silva C, Alberti A, Seeleuthner Y, Blanc-Mathieu R, Lima-Mendez G, Rocha F, Tirichine L, Labadie K, Kirilovsky A, Bertrand A, Engelen S, Madoui M-A, Méheust R, Poulain J, Romac S, Richter DJ, Yoshikawa G, Dimier C, Kandels-Lewis S, Picheral M, Searson S, Tara Oceans Coordinators, Acinas SG, Boss E, Follows M, Gorsky G, Grimsley N, Karp-Boss L, Krzic U, Pesant S, Reynaud EG, Sardet C, Sieracki M, Speich S, Stemmann L, Velayoudon D, Weissenbach J, Jaillon O, Aury J-M, Karsenti E, Sullivan MB, Sunagawa S, Bork P, Not F, Hingamp P, Raes J, Guidi L, Ogata H, De Vargas C, Iudicone D, Bowler C, Wincker P (2018) A global ocean atlas of eukaryotic genes. Nat Commun 9: 373
24. Buck M, Garcia SL, Fernandez L, Martin G, Martinez-Rodriguez GA, Saarenheimo J, Zopfi J, Bertilsson S, Peura S (2021) Comprehensive dataset of shotgun metagenomes from oxygen stratified freshwater lakes and ponds. Sci Data 8: 131

Microbial rhodopsins – from structure to function and ecological adaptation

Małgorzata Malczewska, Anna Karnkowska✉

Institute of Evolutionary Biology, Faculty of Biology, University of Warsaw

✉ corresponding author: a.karnkowska@uw.edu.pl

Keywords: Archaea, Bacteria, horizontal gene transfer, microbial rhodopsins, opsins, protists

Rhodopsin proteins are found in all three domains of life, and the two best-known types to date are animal and microbial rhodopsins. Animal rhodopsins are found only in animals, while microbial rhodopsins are found in microorganisms in all domains, and mainly in protists among eukaryotes. All known rhodopsins have a similar structure, consisting of seven transmembrane α-helices and a retinal ligand. Animal and microbial types do not show sequence similarity, suggesting their convergent evolution. Animal rhodopsins are responsible for vision and control of the biological clock, while microbial rhodopsins are responsible for cell phototaxis and also act as hydrogen or ion pumps. These processes may be involved in converting energy from photons into energy used by the cell. A lot more is known about rhodopsins in marine microorganisms than in freshwater ones. The differences between rhodopsins appearing in these two ecosystems can be significant because they are characterized by different environmental conditions, which lead to different optical properties, consequently affecting the sequences and structure of rhodopsins.

