

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ КАНАЛЬНЫХ РОДОПСИНОВ ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ БЕЛОМОРСКОГО БАССЕЙНА

© 2024 О.В. Карпова^{1*}, Е.Н. Виноградова^{1,2}, А.М. Мойсенович¹, О.Б. Пустовит¹, А.А. Рамонова¹, Д.В. Абрамочкин¹, Е.С. Лобакова¹

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: olgakarpova@yandex.ru

² НИЦ «Курчатовский Институт», НБИКС Геномный Центр, 123182 Москва, Россия

Поступила в редакцию 03.03.2024

После доработки 31.05.2024

Принята к публикации 19.06.2024

Оптогенетика как метод светуправляемой регуляции клеточных процессов базируется на применении канальных родопсинов, напрямую генерирующих фотоиндуцированные токи. Наибольшее количество генов канальных родопсинов идентифицировано у зеленых микроводорослей Chlorophyta, и запрос на увеличение числа функционально охарактеризованных канальных родопсинов и разнообразие их фотохимических параметров постоянно растет. Мы провели экспрессионный анализ генов катионных канальных родопсинов (CCR) в природных изолятах микроводорослей родов *Haematococcus* и *Bracteacoccus* из уникальной зоны Полярного круга. Обнаруженный полноразмерный CCR транскрипт *Haematococcus lacustris* является продуктом альтернативного сплайсинга и кодирует белок H198CCR2, не обладающий фотохимической активностью. 5'-Концевой фрагмент транскрипта CCR *Bracteacoccus aggregatus* кодирует белок Ba34CCR, содержащий консервативный мембранный домен TM1–TM7 и короткий участок цитозольного фрагмента. При гетерологичной экспрессии фрагмента TM1–TM7 в культуре клеток СНО-К1 наблюдалась светозависимая генерация тока, параметры которого соответствуют характеристикам CCR. Впервые обнаруженный функциональный канальный родопсин *Bracteacoccus* не имеет близких гомологов CCR и может представлять интерес в качестве кандидата для оптогенетики.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: канальные родопсины, зеленые водоросли, фотоиндуцированный ток, оптогенетика.

DOI: 10.31857/S0320972524080023 EDN: KEESUH

ВВЕДЕНИЕ

Канальные родопсины представляют особую группу интегральных мембранных ретиналь-связывающих белков, которые в ответ на активацию светом напрямую осуществляют пассивный ионный транспорт, в отличие от остальных родопсинов (в частности, зрительных), регулирующих ионные каналы опосредованно, через активацию энзиматических каскадов [1]. В природе канальные родопсины обнаружены преимущественно у

подвижных фототрофных организмов, микроводорослей Chlorophyta и Cryptophyta, где выполняют функции фоторецепторов, участвующих в фототаксисе. Впервые фотоэлектрический ответ при фототаксисе *in vivo* был показан на клетках зеленой водоросли *Haematococcus pluvialis* [2] и впоследствии детально изучен на зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* [3]. Идентифицированные фоторецепторы CrChR1 и CrChR2 *C. reinhardtii* являются катионными канальными родопсинами (CCR) и различаются как по параметрам фотоиндукции, так и по кинетике фотоэлектрического ответа [3, 4]. Предполагается, что основную роль при фототаксисе выполняет CrChR2, в то время как CrChR1 участвует в защите от света высокой интенсивности.

Принятые сокращения: CCR – катионные канальные родопсины; RACE – метод быстрой амплификации концов кДНК.

* Адресат для корреспонденции.

Благодаря своим уникальным качествам канальные родопсины нашли широкое применение в оптогенетике – методе светууправляемой регуляции процессов в клетке. В оптогенетическом эксперименте при гетерологичной экспрессии в клетках-мишенях гены канальных родопсинов и ионных помп со специфичностью к катионам и анионам обеспечивают деполяризацию и гиперполяризацию клеточной мембраны и позволяют таким образом регулировать нейрональную активность [5]. Несмотря на огромный прогресс в поиске новых генов канальных родопсинов методами геномного анализа, количество генов, кодирующих белки с экспериментально подтвержденной функциональной активностью, все еще очень ограничено [6]. В результате до сих пор для оптогенетических исследований наиболее изученным и применяемым в различных модификациях остается катионный канальный родопсин CrChR2 зеленой водоросли *C. reinhardtii*.

Наш проект нацелен на поиск новых генов канальных родопсинов у одноклеточных водорослей Chlorophyta и Cryptophyta Беломорского бассейна и базируется на уникальной коллекции природных изолятов микроводорослей NAMSU (<https://depo.msu.ru/open/public/search?collection=algabiotech>), созданной на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ. Представленные здесь результаты получены в продолжение нашего исследования по поиску новых ССР в зеленых водорослях *Haematococcus* и *Bracteacoccus*. Ранее с помощью разработанного нами ПЦР-теста впервые было показано наличие гена ССР (34CCR) в микроводоросли рода *Bracteacoccus*; также в двух изолятах *Haematococcus lacustris* были обнаружены гены ССР (37CCR и негомологичные гены 98CCR1, 98CCR1-1), соответствующие уже идентифицированным генам ССР *H. lacustris* [7]. Таким образом, данный ПЦР-тест оказался эффективен не только для анализа таксономической группы на присутствие генов ССР, но и для анализа мультигенных семейств ССР.

Для изучения экспрессии обнаруженных ССР-генов *Haematococcus* и *Bracteacoccus* были получены их транскрипты, проведен структурный анализ их белковых продуктов (H198CCR2 и Va34CCR) и определена функциональная активность H198CCR2 и Va34CCR при гетерологичной экспрессии в культуре клеток китайского хомячка СНО-K1. Мы показали, что белки H198CCR2 и Va34CCR содержат 7 консервативных мембранных участков (ТМ1–ТМ7) трансмембранной локализации и способны к образованию гомодимеров, что типично для пространственной структуры канальных родопсинов. В электрофизиологических экспериментах с трансфицированными клетками СНО-K1 по методике пэтч-кламп было показано,

что экспрессируемый белок Va34CCR способен к светозависимой генерации тока и по параметрам сопоставим с катионным канальным родопсином CrChR2 *C. reinhardtii*. Таким образом, мы впервые обнаружили и охарактеризовали функциональный катионный канальный родопсин из зеленой микроводоросли *Bracteacoccus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Происхождение штаммов зеленых водорослей (Chlorophyta) и условия культивирования подробно описаны ранее [7]. Для выделения тотальной РНК использовали активно растущие культуры *H. lacustris* NAMSU-BM-7/15 и *B. aggregatus* NAMSU-BM-5/15 в среде BG-11 при инкубации в течение 1–2 недель при 25 °С и освещении белым светом 40 мкмоль квантов ФАР м⁻²·с⁻¹.

Выделение РНК и получение ССР-специфических транскриптов. Суммарную РНК выделяли из 5–10 мл культур с помощью набора RNeasy plus («Qiagen», США). Для экстракции РНК образцы (~100 мг сырого веса) лизировали механическим разрушением в дезинтеграторе FastPrep-24™ 5G («MP Biomedicals», США) в присутствии микробусин Lysing Matrix type A. Для приготовления кДНК брали 250 нг РНК; полноразмерные транскрипты получали по методу быстрой амплификации концов кДНК (RACE) с использованием набора Mint-RACE («Евроген», Россия). Полученные ПЦР-продукты анализировали электрофорезом в 1%-ной агарозе и элюировали из геля с помощью набора Cleanup Mini («Евроген»). Далее, ПЦР-продукты секвенировали по методу Сэнгера (ЦПК «Геном» при ИМБ РАН, Россия), последовательности выравнивали и совмещали по участкам гомологии (BLASTn, NCBI).

Структурно-функциональные характеристики транслированных продуктов ССР-специфических транскриптов и 3D-моделирование. Для анализа транслированных аминокислотных последовательностей продуктов полученных ССР-транскриптов использовали построение гомологии с ранее идентифицированными белками ССР Chlorophyta методом множественного выравнивания CLUSTAL Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). 3D-Моделирование выполняли в программе SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) с использованием кристаллической структуры CrChR2 *C. reinhardtii* в качестве матрицы.

Гетерологичная экспрессия родопсинов в культуре клеток СНО-K1. Конструирование экспрессионных плазмид. Для экспрессии в клетках млекопитающих нуклеотидные последовательности транскриптов H198CCR2 (полная рамка

считывания, 350 а.о.) и Ва34CCR (1–295 а.о.) были кодон-оптимизированы (GeneArt; «Thermo Fisher Scientific», США), выполнен химический синтез обоих генов («Евроген») и проведено их субклонирование в экспрессионный вектор pcDNA3.1 eYFP[8] по рестрикторным сайтам BamHI и NotI.

Трансфекция экспрессионных плазмид в культуру клеток CHO-K1. Для гетерологичной экспрессии белков Ва34CCR и Н198CCR2 использовали иммортализованную линию эпителиальных клеток яичников китайского хомячка *Crictulus griseus* CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary cells). Трансфекцию клеток экспрессионными векторами pcDNA3.1 eYFP. Ва34CCR и pcDNA3.1 eYFP. Н198CCR2 выполняли с использованием реагента Lipofectamine® LTX with Plus™ Reagent («Thermo Fisher Scientific»). Маркером успешной трансфекции являлась флуоресценция клеток под действием света при длине волны 490 нм. Трансфицированные клетки содержали в стандартных условиях культивирования в питательной среде DMEM/F12 («Gibco», «Thermo Fisher Scientific», США) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS; «HyClone», США), 2 мМ глутамин («Sigma-Aldrich», США) и 100 мкг/мл пенициллин-стрептомицин («Gibco», «Thermo Fisher Scientific») при 37 °С в атмосфере 21% O₂ и 5% CO₂. Через 24 ч после трансфекции в культуральную среду добавляли 1 мкМ транс-ретинола R2500 («Sigma-Aldrich»).

Флуоресцентная микроскопия экспрессированных родопсинов. Для определения локализации экспрессированных белков Ва34CCR и Н198CCR2 трансфицированные клетки линии CHO-K1 обрабатывали флуоресцентными красителями, специфическими для цитоплазматических мембран (CellBrite Red; «Biotium», Великобритания) и ядер (Hoechst 33342, «Thermo Fisher Scientific»). Для этого клетки инкубировали с 10 мкМ CellBrite Red в нормальной среде, содержащей 1% ДМСО и 5 мкг/мл Hoechst 33342, в течение 15 мин, дважды промывали буфером PBS и один раз – DMEM. Прижизненные изображения были получены с использованием системы жизнеобеспечения на микроскопе Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 («Nikon Corporation», Япония) и объективом Apo TIRF 63×/1,49. Все захваты изображений были получены при одинаковых настройках динамического диапазона.

Определение фотоэлектрической активности родопсинов Ва34CCR и Н198CCR2. Электрофизиологические эксперименты проводили через 48 ч после трансфекции. Светоиндуцированный ток Н198CCR2 (I₉₈) или Ва34CCR (I₃₄) регистрировали в трансфицированных клетках CHO-K1 с помощью техники пэтч-кламп в конфигурации whole-cell в режиме фиксации потенциала.

Использовали усилитель Axopatch 200A («Molecular Devices», США).

Покровное стекло с культурой CHO-K1 помещали в экспериментальную камеру и перфузировали при комнатной температуре (23 ± 0,5 °С) раствором следующего состава: 150 мМ NaCl; 5,4 мМ KCl; 1,8 мМ CaCl₂; 1,2 мМ MgCl₂; 10 мМ глюкозы; 10 мМ HEPES (pH 7,6). Для регистрации выбирали только клетки, испускавшие зеленое флуоресцентное свечение при облучении их возбуждающим светом с длиной волны 490 нм. Пэтч-пипетки сопротивлением 2–2,5 МОм изготавливали из боросиликатного стекла («Sutter», США) и заполняли раствором следующего состава: 140 мМ KCl; 1 мМ MgCl₂; 5 мМ EGTA; 4 мМ MgATP; 10 мМ HEPES; 0,03 мМ Na₂GTP (pH 7,2). Перед началом регистрации тока компенсировали емкость пипетки, емкость исследуемой клетки и сопротивление доступа, а также выключали как проходящий свет, так и свет с длиной волны 490 нм. При обработке данных амплитуды токов нормировали на емкость клетки и выражали в пА/пФ.

Для регистрации I₉₈ и I₃₄ использовали два различных протокола, позволяющих изучить соответственно зависимость плотности токов от интенсивности возбуждающего света и вольт-амперную зависимость токов. В обоих протоколах использовали поддерживаемый потенциал –60 мВ. В первом протоколе устанавливали значение потенциала, равное 0 мВ, а затем включали свет 490 нм на 1 с; возникающий при этом выходящий ток являлся светоиндуцированным, поскольку ток утечки при потенциале 0 мВ отсутствует. Последовательно подавали свет интенсивностью 1, 2, 3, 5, 10, 20, 50 и 100% от максимально возможной для источника света CoolLED pE-100 («CoolLED», Великобритания). Абсолютные значения интенсивности света определяли с помощью датчика PM160T («Thorlabs», США). Во втором протоколе потенциал ступенчато изменяли от поддерживаемого потенциала до значений от –100 до +60 мВ с шагом 20 мВ на 2 с, при этом во время каждой из ступенек на 1 с включали свет 490 нм с интенсивностью 50% от максимума. Светоиндуцированный ток в этом случае вычисляли как разность между током в присутствии и при отсутствии возбуждающего света при каждом из значений мембранного потенциала. В обоих случаях измеряли как максимальное (пиковое) значение светоиндуцированного тока, так и уровень плато тока (среднее значение тока в интервале 500–1000 мс подачи света). Статистическую обработку результатов и построение графиков проводили с помощью программы GraphPad Prism 7. Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение CCR-транскриптов из зеленых микроводорослей *Haematococcus* и *Bracteacoccus*. Суммарную РНК *Haematococcus* и *Bracteacoccus* выделяли, как описано в разделе «Материалы и методы», после чего CCR-специфические транскрипты получали по методу быстрой амплификации концов кДНК (RACE). Процедуру RACE выполняли последовательно за 3 раунда ПЦР, согласно табл. 1.

В результате проделанной работы были получены полноразмерный транскрипт гена CCR *H. lacustris* NAMSU-BM-7/15 и 5'-концевой фрагмент транскрипта гена CCR *B. aggregatus* NAMSU-BM-5/15.

Транскрипт CCR *Haematococcus* не является продуктом ни одного из идентифицированных нами генов: *98CCR1* (GenBank: ON643073.1) и *98CCR1-1* (GenBank: ON643074.1), как предполагалось исходно, но впоследствии мы идентифицировали его как ген *98CCR2* (данные не приведены). Гомология между полученным транскриптом *H198CCR2* (GenBank: PP103616) и геном *98CCR1* составляет 81,9%.

Нам не удалось получить полноразмерный транскрипт гена CCR *Bracteacoccus* NAMSU-BM-5/15, но определено, что 5'-концевой фрагмент транскрипта *Va34CCR* (GenBank: PP103617) является продуктом ранее идентифицированного гена *34CCR* (GenBank: ON643076.1). К настоящему времени транскрипт *Va34CCR* целиком прокартирован по геномной последовательности; установлено, что соответствующий участок гена содержит 4 интрона.

Структурно-функциональные характеристики белковых продуктов *H198CCR2*, *Va34CCR* и 3Д-моделирование. Для определения структурно-функциональных характеристик использовали построение гомологии путем выравнивания транслированных аминокислотных последовательностей нативных CCR-транскриптов, полу-

ченных методом гомологичного клонирования [9] либо идентифицированных при анализе транскриптомов [3, 10, 11].

На рис. 1 представлено выравнивание транслированных аминокислотных последовательностей продуктов генов CCR *Haematococcus* и их нативных транскриптов. Как показано на рис. 1, продукты *H137CCR*, *H198CCR1*, *H198CCR2* и *H198CCR1-1* содержат 7 мембранных спиралей и консервативные аминокислотные остатки, типичные для канальных родопсинов. Присутствуют участок связывания ретиналя Lys257, Glu (82, 83, 101 и 123), а также Glu90, определяющий специфичность родопсинов к переносу катионов [1, 6]. Также консервативными являются Glu235 и Ser245, участвующие в определении pH-зависимости спектральных характеристик CCR-белков. Как было показано Hou et al. [9] на CCR *Mesostigma viride*, замена Ser в положении 245 на Glu приводила к полной потере канальной активности. Ser321 является единственным сайтом фосфорилирования белка CrChR2, который располагается в консервативном участке цитозольной петли, примыкающей к трансмембранному домену TM7 (helix 7). Мы не смогли определить наличие сайта фосфорилирования у *H198CCR2*, поскольку 3'-конец транскрипта является низкогомологичным.

Ближайшим гомологом продукта частичного транскрипта *Va34CCR B. aggregatus* NAMSU-BM-5/15 является CrChR2 *C. reinhardtii* (59,2% идентичности при 73% покрытия последовательности). На рис. 2 представлено выравнивание транслированных аминокислотных последовательностей *Va34CCR* и нативных CCR-транскриптов из разных видов *Chlamydomonas*. Транскрипт *Va34CCR* кодирует целиком мембранный фрагмент TM1–TM7 со всеми консервативными аминокислотными остатками в наличии и уникальный Lys-обогащенный фрагмент, не имеющий гомологии.

Таким образом, на основании анализа первичной структуры продуктов нативных тран-

Таблица 1. ПЦР-праймеры для амплификации кДНК CCR *Haematococcus* и *Bracteacoccus*

RACE, раунды		Ген-специфические праймеры	
		<i>Haematococcus</i>	<i>Bracteacoccus</i>
RACE 5'	раунд 1	CCR_rev: CCCTTGGGMACDGTRTGGTA	34CCR-ORF_rev: ACCACAGTGTGCGGACGA
	раунд 2	Haе-687_rev: GTTGGGTGGACTCATAGCCGCAG	34CCR1_rev: CCGTAGCACAACCAATGCAGA
	раунд 3	98CCR1_rev: GGTGCGTTTGAGTAGTCATCC	34CCR2_rev: CAAACCCGTCAGGTTGACAAG
RACE 3'	раунд 1	CCR_fwd: YGGHTGGGARGAGRTBTACGT	34CCR1_fwd: CTTGTCCAACCTGACGGGTTTG
	раунд 2	Haе-536_fwd: GGAGTGGTTACTGTATGCCAGT	34CCR2_fwd: TCTGCATTGGTTTGTGCTACGG
	раунд 3	98CCR1_fwd: GGATGACTACTCCAAACGCACC	34CCR3_fwd: TCGTCGCGCACACTGTGGT

H137CCR	-----	0
HNG2Chr	MTAKTDQGVTKWLLTKKALEERRGLDMEAAA-KR-----IALAEVL	42
H198CCR2	-----MLPNMMGYSLAAL-TLLCVSPYPRAEASLSKFLLFDEGPG	41
HpChR1	-----MRICLGLLAVA-LATLTLPCPPVNASLSKFLLFFGNSPG	38
H198CCR1	-----	0
CrChR2	-----MDYGGALS-----	8
HdChR	-----MSVNLSLWEHGEDAGYGHWYQ-----	21
HpChR	-----MESLVMRSLLAGSTQPTNLLPGDKVSAGYDHYWI-----	34
H198CCR1-1	-----	0
_____HELIХ 1_____		
H137CCR	-----	0
HNG2Chr	VHGTADTTIRPKDAEAFSRMTANEDWACGPADDCCYKWNKSHGNDSEKLGAKVMSWIVF	102
H198CCR2	LVPNSTVAYGEELYRGFHTLEANSDWVVGPRDTCYCEKWAWSHGTKDEKLGAIIVAMFIVF	101
HpChR1	LVPNTTAYGEELYRGFHQLLEANGDWVVGPRDSCYCEKWAWSHGTKDEKLGAIIVAMFIVF	98
H198CCR1	-----	0
CrChR2	-----AVGRELLFVTNPV-VVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQWLAA	60
HdChR	-----GTPNGT-----LVCSHEDNIAWLKNGTDEEMLGANICMWMMAF	59
HpChR	-----NTGDEI-----LVCTEEANAALWESHGKGEKTVLVCQWFAF	72
H198CCR1-1	-----	0
_____HELIХ 2_____		
H137CCR	-----AQLVIAIFHIESPSTMYLSTGNQVLWSX	29
HNG2Chr	AIC-----GGWIVVYVCIIIAHVCIATWHITDSPSTLYLSTGNQALWLR	147
H198CCR2	GSCVGFALFYGAARSTCGWIVVYVCVIELCHVLIATFHEIESPSTLYLSTGNQVLWLR	161
HpChR1	GSCVGFALFYGVAARWTTGWIIVVYVCVIELAHVLIATFHEIESPSTLYLSTGNQVLWLR	158
H198CCR1	-----AHVLIATFHEIESPSTLYLSTGNQVLWLR	29
CrChR2	GFISILLMFAYQTKWSTCGWIVYVCAIIMVKVILIFFFKNPMSMLYLATGHRVQWLR	120
HdChR	AACLCLCFYAYSTWRATCGWIVVYVCLVIMVKVMIIVFHNDSPATLYLSTGNFIMWIR	119
HpChR	CACIIILMIYAYHTWKATSGWIVVYVCCVILIKVLMVIYHFDHPCTLYLSTGNWILWLR	132
H198CCR1-1	-----IYHFDHPCTLYLSTGNWILWLR	23
::* . * . :***: * _____HELIХ 3_____ _____HELIХ 4_____		
H137CCR	YGVLLSCLPVILIHLSNLTGRKDEXCKRTMGLGISDIGPMVHGTSEHMSPPANYRKVIVRF	89
HNG2Chr	YAVLLSCLPVILIHLSNLTGMKNDYSKRTMGLLVSDIGTIVFGCTAAMAGVGLKILFWF	207
H198CCR2	YAVLLSCLPVILIHLSNLTGMKDDYSKRTMGLLVSDIGTIVFGTAAAMSPPGYKIIFFW	221
HpChR1	YAVLLSCLPVILIHLSNLTGMKDDYSKRTMGLLVSDIGTIVFGTAAAMSPPNYLKVIFFW	218
H198CCR1	YAVLLSCLPVILIHLSNLTGMKDDYSKRTMGLLIRDIGTIVSGTAAAMSPPNYLK----	84
CrChR2	YAVLLTCLPVILIHLSNLTGLSNDYSRRTMGLLVSDIGTIVWGATASAMA-TGYVKVIFFC	179
HdChR	YGVLLSCLPVILIHLSNITGLDQYSKRTMQLLVSDLGTITMGVTAALC-GNYVKWIFFI	178
HpChR	YGVLLTCLPVILIHLSNITGLKNDYKRTMGLLVSDIGCVVMGVTAALC-YDYKKWIFVC	191
H198CCR1-1	YGVLLTCLPVILIHLSNITGLKNDYKRTMGLLVSDIGCVVMGVTAALC-YDYKKWIFVC	82
* .***.*****.** ..: :*** * :*:* :. * :. :. * * _____HELIХ 5_____ _____HELIХ 6_____		
H137CCR	WGLWY-----	94
HNG2Chr	MGLSYGCSFFLVAKVYIEAYHTVPGICRITVRMLAYDFFGSWCMFPIIFALGPEGFGH	267
H198CCR2	CGLCYGMITFYLAQVYIEAYHTVPGICRKRIVRAMAWDYFGSWCMFPIIFVLGPEGFGH	281
HpChR1	CGLSYGVTFYLAQVYIEAYHTVPGICRKRIVRFMAWDYFGSWCMFPIIFVLGPEGFGH	278
H198CCR1	-----	84
CrChR2	LGLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPGRCRQVVTGMAWLFFVSWGMPILFVLGPEGFGV	239
HdChR	LGLCYGVNTYFHAAKVYIESYHIVPGVCRVCRVMWCFGAWTCYPLLFVFGPEGLGV	238
HpChR	LGLCYGSNTYFHAAKVYIEGYHTVPGHCRNVRLMAWCFYMAWTFPIFLVGPGLGK	251
H198CCR1-1	LGLCYGSNTYFHAAK-----	97
_____HELIХ 7_____		
H137CCR	-----	94
HNG2Chr	ITAYGSMIAHFILDITSNLWGLGGHLLRVKIHHEIILHGNITRKTITVAGDPVEVEEY	327
H198CCR2	ISAYGSMIAHQVLDITSNLWSLMGHMLRVKVSQKPRVSLAGCGRHYLSAGRASSSCQL	341
HpChR1	ISAYGSMIAHQVLDITSNLWSMAGHFLRVKIHHEIIVHGNITKTKITLAGEPVEVEEY	338
H198CCR1	-----	84
CrChR2	LSVYGSIVGHTIIDLMSNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTKLNIIGTEIEVETL	299
HdChR	LSYNASAIHGHTIIDIFSQVWGFVGHYLRKIHHEIIVHGNLVKPTKVKVAGMEIDAEEEM	298
HpChR	LSVYGSITLHTVADVLSQLWTLGLHHLRVKIHHEIIVHGNLTKTMKVTVAGEDKEVEEM	311
H198CCR1-1	-----	97

H137CCR	-----	94
HNG2Chr	VDEAEAA-EEDPKVNVKGTQDLRN-----	350
H198CCR2	-----AARLDIVIV-----	350
HpChR1	IDSNEVDPAEMDQVQDKGTQA-----	359
H198CCR1	-----	84
CrChR2	VEDEAEAG----AVNKGTKGYASRESFLVMRDKMKEKGDIVRASLDNSKEVEQEQAARA	354
HdChR	VEKD-EEG----AI-----	307
HpChR	VDSM-EEG----AKDNGTSALAGRESFIIMRDRMKQKQIEVRAS-----	350
H198CCR1-1	-----	97

Рис. 1. Выравнивание транслированных аминокислотных последовательностей (CLUSTAL Omega) продуктов генов CCR *Haematococcus* и их нативных транскриптов. H137CCR, 94 а.о.; H198CCR1, 84 а.о.; H198CCR1-1, 97 а.о. – фрагменты генов CCR *H. lacustris* [7]; H198CCR2, 350 а.о. – нативный транскрипт гена *98CCR2*; нативные транскрипты – HpChR1 *H. pluvialis (lacustris)*, 677 а.о. (GenBank: JN596950, [9]); HpChR *H. pluvialis (lacustris)*, 449 а.о. [11]; HNG2Chr *Haematococcus* sp. NG2, 350 а.о. [11]; HdChR *H. droebakensis* (GenBank: KF992059, 307 а.о. [10]); CrChR2 *C. reinhardtii*, 737 а.о. (GenBank: AF508966, [3]). Функционально значимые аминокислотные остатки (даны в нумерации CrChR2) выделены цветом: Glu (82, 83, 90, 97, 101 и 123) – красным; Glu235 и Ser245 – голубым; Lys257 – зеленым; Ser321 – желтым

Ba34CCR	-----MSADFIIMRG---L-LNAAA	15
CaChR1	MDTLAWARELLSTAHDATPATAT----PST-DHSTPSTDHGSGETFN--VTIIGGGH	52
CyChR1	MDTLAWARELLSSGHGDTATDS----GHGDTDSGGHSDSHDAVAHN--VTLLIAPPH	53
CraChR2	-----MASMAFSAISLASAMRSLQASGGNPFEDHAPPDINSCELTPTYGCLNDFYCNPA-	53
CrChR1	MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYV--FHRAH--ERMLFQTS-	55
CrChR2	-----MDYGGALSAVG--RELLFVTN-	19
HELIХ 1		
Ba34CCR	ATTDSHAEDT-----SSGHDDHAEACYCLA-VHSHGANYEKIMMILQWFMFAFSIG	66
CaChR1	HGGHAGPVDN-SIVIGGIDGWIAPAGDCYCAGWYVSHGSSFEATFAHVCQWSIFAVCIL	111
CyChR1	AGGHAGPTDT-SQQTIGIDGWIAPAGDCYCAGWYVSHGSSFEATFAHVCQWSIFAVCVL	112
CraChR2	----YGLADAGYNYCVQSAVGKLAIVQTDQLSWLYSHGSSGAKAASIAFQWLAFAATAVI	109
CrChR1	----YTLNNGSVICIPN-----NGQCFLANLKSNGTNAEKLAAANILQWITFALSAL	104
CrChR2	----PVVNGSV--LVP-----EDQCFCAGWIESRGTNGAQTASNLQWLAAGFSIL	65
HELIХ 2		
Ba34CCR	CLCFYAYHSFKATCGWEVYVCCIEILIKVLIIFAFITYSPTVTQVNGVTPWLRYSGL	126
CaChR1	SLLWYAWQYWKATCGWEVYVCCIEILVFCIFLYHFDSPCSLYLSTANVNWLRYSGL	171
CyChR1	SLLWYAYQYWKATCGWEVYVCCIEILVFCIFLYHFDSPCSLYLSTSNVNWLRYSGL	172
CraChR2	GLMFYAWDTWKATTGWEEVYVCTIILIKVLIIFKFEIPCSLYLPTGNVWVLRYSGL	169
CrChR1	CLMFYGYQTKWSTCGWEIYVATIEIMIKFIIYFHFDEPAVYSSNGNKTVWLRYSGL	164
CrChR2	LLMFYAYQTKWSTCGWEIYVCAIEIMVKVLIIFFFFKNPSMLYLATGHRVQWLRYSGL	125
HELIХ 3		
Ba34CCR	LTCPVILIHLSNLTGLKNNYSKRTMMLMSDLGTIVMGITAAALSSSPIKIIFFCIGLCYG	186
CaChR1	LCCPVILIHLSNVTGLSDDYGRRTMGLLVSDIATIVFGITAAMLVSWPKIIFVLLGFMTG	231
CyChR1	LCCPVILIHLSNVTGLSDDYGRRTMGLLVSDIATIVFGVTAAMLVWPKIIFVLLGFMTG	232
CraChR2	LTCPVILIHLSNITGLKDDYKRTMRLVSDIGTIVMGVTSAMTVGYLKWIFFAIGLLYG	229
CrChR1	LTCPVILIHLSNLTGLANDYNKRTMGLLVSDIGTIVMGTTAALSKGYVRVIFFLMGLCYG	224
CrChR2	LTCPVILIHLSNLTGLSNDYSRRTMGLLVSDIGTIVMGVTSAMATGVYKVIFFCIGLCYG	185
HELIХ 4		
Ba34CCR	CNTWFHAAKVYVEAYHSVPKGECEKRTIVKVMAWLFFASWTAFFPILFVMGPEFGHGLTYGG	246
CaChR1	CYTFYLAQVIEISFHVQVPGKICRHLVKAMAITYYVGSFPLIFLFGQSGFKKISPYAD	291
CyChR1	CYTFFLAAKVLIESFHVQVPGKICRHLVKAMAITYVGSFPLIFLFGQSGFKKISPYAD	292
CraChR2	SNTYFHSAKVYIEAYHTVPKGRCRIVRLMAYCFYLAWTMFPILFALGPEGMGQMSAYMS	289
CrChR1	IYTFHNAKVYIEAYHTVPKICRDLVRYLAWLYFCSWAMFPVLLFALGPEFGGHINQFNS	284
CrChR2	ANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGRCRQVVTGMAWLFFVSWGMFPILFALGPEFGVLSVYGS	245
HELIХ 5		
Ba34CCR	IYAHTVVDVFMKLNWGLFGHHLRIKVRGTQKKR-----VKTQKKGPKKGDARM-----	294
CaChR1	VIASSFGDLISKNMFGLLGHFLRVKIHIEHILKHGDIRKTTHLRIAGEEKEVETFVEEED	351
CyChR1	VIASSFGDLISKNAFGMLGHFLRVKIHIEHILKHGDIRKTTHLRIAGEEKEVETFVEEED	352
CraChR2	TILTTIADVLSKQIWGLLGHHLRVKIYQHILIHGDIRKTTMQVGGEDVEVEEFVDEED	349
CrChR1	ATAHAIDLASKNAWSMGMHFLRVKIHIEHILYGDIRKQKQVNVAGQEMEVETMVEEDD	344
CrChR2	TVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHIEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLVEDEAE	305
HELIХ 6		
Ba34CCR	-----TGPPAWPAVRHQ-KQCGMSC---LHQ---GEATSCGRH-----	325
CaChR1	D-TVKHSTKELANRGSFIVMRGNMKAQGDIVRASLDMEDEEGGMG-----	396
CyChR1	D-TAKHSTKELANRGSFIVMRDKMKEQGDIVRASLDMEDEEARTG-----	397
CraChR2	EGV-RQANTQLANRESFVNHMAEQMKNGIEVRATYDTGVDKEM-----	391
CrChR1	E-TQKVPTAKYANRDSFIIMRDRLEKGFETRASLDGDPNGDAEANAAGGKPGMEMGKM	403
CrChR2	AGAVNKGTKGYASRESFLVMRDKMKEGDIVRASLDNSKEVEQEQAARA----AMMMNG	361
HELIХ 7		
Ba34CCR	IVAHSTVVDVFMKLNWGLFGHHLRIKVRGTQKKR-----VKTQKKGPKKGDARM-----	294
CaChR1	VIASSFGDLISKNMFGLLGHFLRVKIHIEHILKHGDIRKTTHLRIAGEEKEVETFVEEED	351
CyChR1	VIASSFGDLISKNAFGMLGHFLRVKIHIEHILKHGDIRKTTHLRIAGEEKEVETFVEEED	352
CraChR2	TILTTIADVLSKQIWGLLGHHLRVKIYQHILIHGDIRKTTMQVGGEDVEVEEFVDEED	349
CrChR1	ATAHAIDLASKNAWSMGMHFLRVKIHIEHILYGDIRKQKQVNVAGQEMEVETMVEEDD	344
CrChR2	TVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHIEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLVEDEAE	305

Рис. 2. Выравнивание транслированных аминокислотных последовательностей (CLUSTAL Omega) продуктов нативных CCR-транскриптов *Bracteacoccus* и *Chlamydomonas*. Ba34CCR, 325 а.о. – частичный транскрипт гена 34CCR *B. aggregatus* NAMSU-BM-5/15; нативные транскрипты – CrChR2 *C. reinhardtii*, 737 а.о. (GenBank: AF508966, [3]); CaChR1 *C. augustae*, 715 а.о. (GenBank: JN596951, [9]); CraChR2 *C. raudensis*, 635 а.о. (GenBank: JN596949, [9]); CyChR1 *C. yellowstonensis*, 717 а.о. (GenBank: JN596948, [9]). Функционально значимые аминокислотные остатки (даны в нумерации CrChR2) выделены цветом: Glu (82, 83, 90, 97, 101 и 123) – красным; Glu235 и Ser245 – голубым; Lys257 – зеленым; Ser321 – желтым

скриптов H198CCR2 и Ba34CCR мы делаем вывод, что кодируемые белки содержат 7 консервативных мембранных участков (TM1–TM7), наряду с функционально значимыми аминокислотными остатками, характерными для канальных родопсинов. 3Д-Модели белков H198CCR2 и Ba34CCR также продемонстрировали типичную для канальных родопсинов пространственную структуру: трансмембранную локализацию фрагмента TM1–TM7 и формирование гомодимеров (рис. 3). Эти результаты позволяют идентифицировать белки

H198CCR2 и Ba34CCR как канальные родопсины и указывают на их возможную функциональную активность.

Определение функциональной активности канальных родопсинов Ba34CCR и H198CCR2. Эта задача была выполнена на экспериментальной базе, впервые предложенной Nagel et al. [12, 13]. Было показано, что при экспрессии в ооцитах *Xenopus laevis* или в животных клетках (HEK293, ВНК) канальные родопсины *C. reinhardtii* функционируют как свето-зависимые катионные каналы.

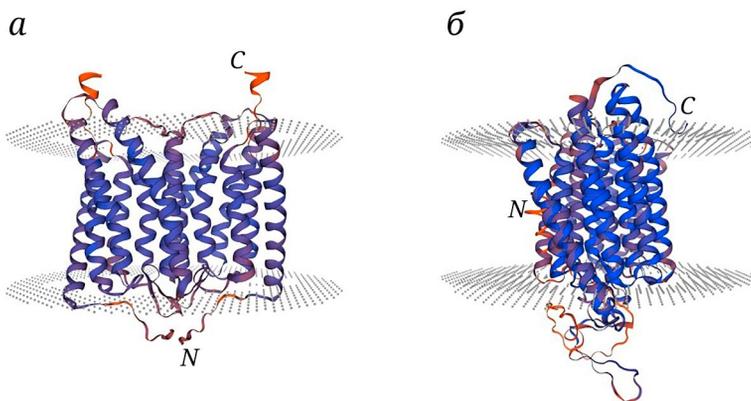


Рис. 3. 3Д-Модели идентифицированных канальных родопсинов (SWISSMODEL) Va34CCR (а) и H198CCR2 (б). В качестве матрицы взята beid.1.A, кристаллическая структура CrChR2 *C. reinhardtii*. N и C указывают локализацию концов полипептидной цепи. Цветовой код (от красного к синему) показывает уровень гомологии с матрицей

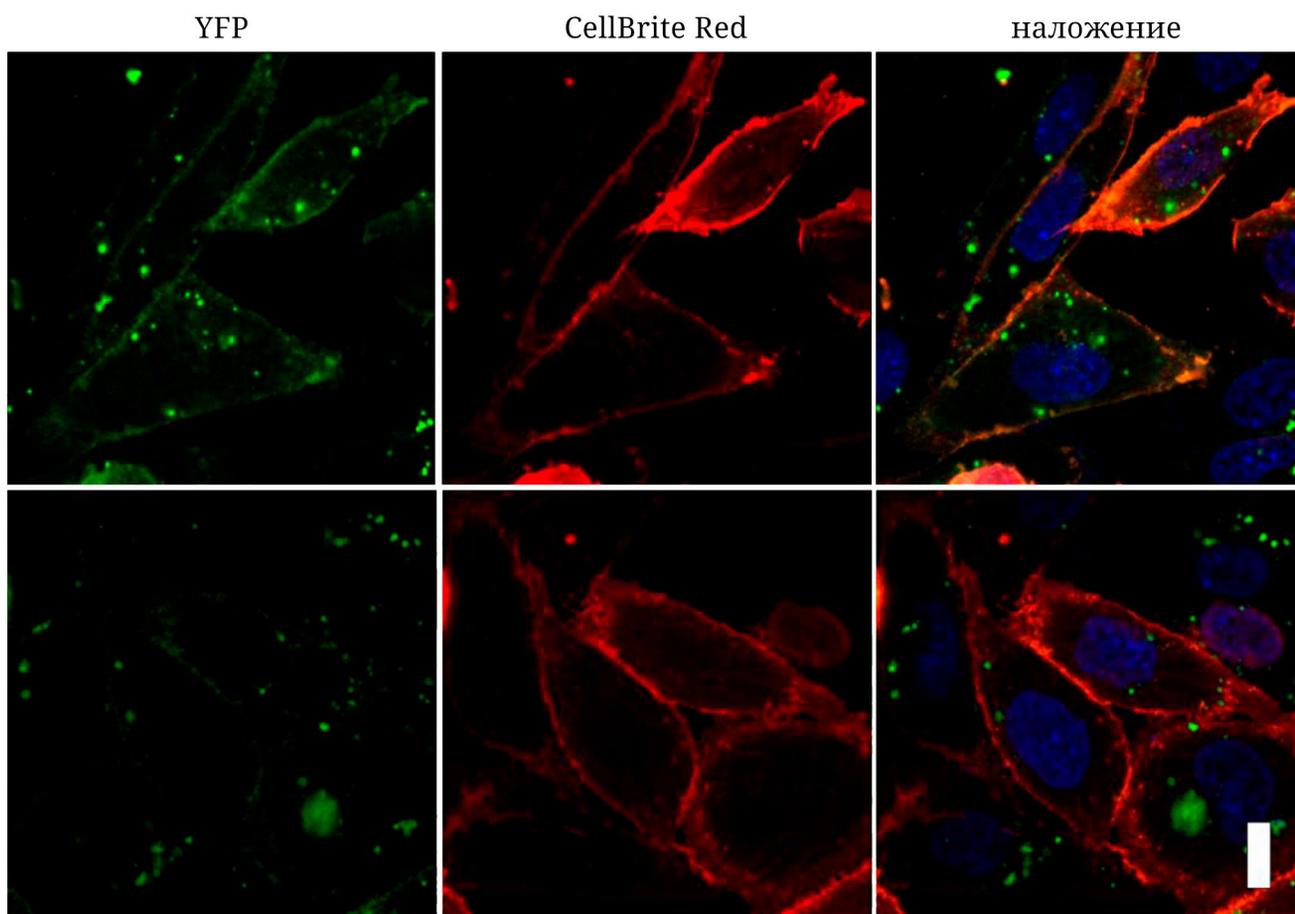


Рис. 4. Исследование локализации экспрессированных родопсинов Va34CCR и H198CCR2 в клетках CHO-K1 методом прижизненной конфокальной микроскопии: Va34CCR-YFP (верхний ряд) и H198CCR2-YFP (нижний ряд). Клеточные мембраны окрашены CellBrite Red, ядра окрашены Hoechst 33342. Линейка – 10 мкм

При этом не только полноразмерные белки, но и их TM1–TM7-фрагменты способны к фотоиндукции ионных токов, которые можно детектировать методом пэтч-кламп (patch-clamp). Таким образом, экспериментальная задача данного этапа заключалась в определении фотоэлектрической актив-

ности родопсинов Va34CCR и H198CCR при гетерологической экспрессии в клетках млекопитающих.

Гетерологическая экспрессия Va34CCR и H198CCR2 в клетках культуры CHO-K1. Для экспрессии в клетках млекопитающих кодон-оптимизированные нуклеотидные последовательно-

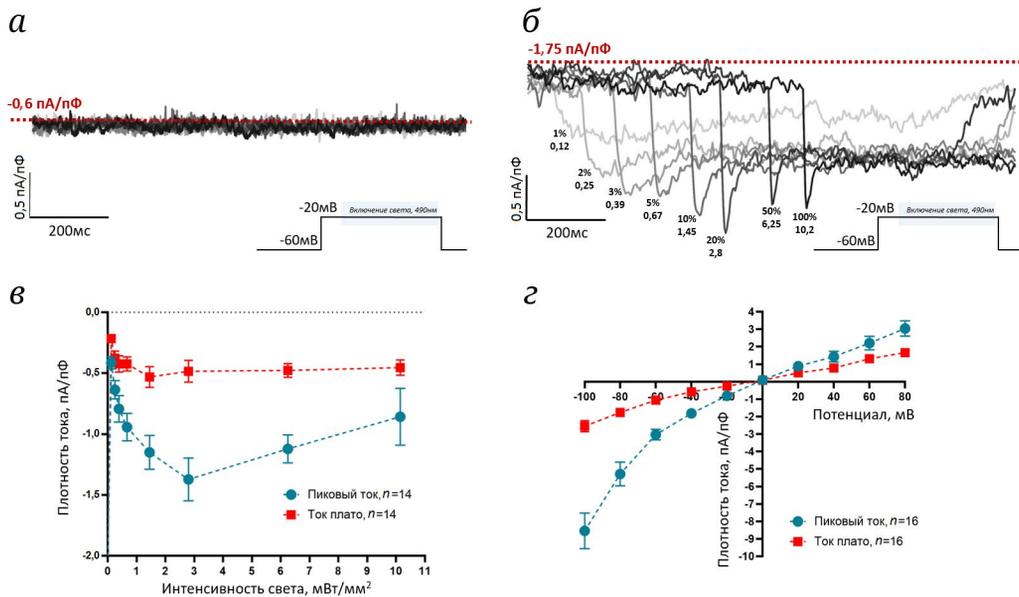


Рис. 5. Характеристика токов, генерируемых белками Va34CCR и H198CCR2 при экспрессии в клетках CHO-K1. *a* – Репрезентативный пример оригинальных записей тока через H198CCR2 (I_{98}), индуцированного включением света с длиной волны 490 нм, различной интенсивности при уровне потенциала -20 мВ. *б* – Репрезентативный пример оригинальных записей тока через Va34CCR (I_{34}) различной интенсивности, индуцированного включением света с длиной волны 490 нм (интенсивность указана у пика каждой из кривых в процентах от максимальной и в абсолютных значениях мВт/мм²), при уровне потенциала -20 мВ. *в* – Зависимость пикового тока I_{34} и тока плато I_{34} от уровня интенсивности света 490 нм. *г* – Вольтамперные кривые пикового тока и стационарного тока (плато) I_{34} , индуцируемого светом 490 нм, при интенсивности 50% от максимума (6,25 мВт/мм²).

сти кДНК H198CCR2 и Va34CCR были субклонированы в экспрессионный вектор pCDNA3.1 eYFP, как описано в разделе «Материалы и методы». При этом анализируемые гены транскрибируются с высокоэффективного промотора цитомегаловируса P_{CMV} и транслируются в одной рамке с YFP в качестве флуоресцентного маркера. Полученные экспрессионные плазмиды pCDNA3.1 eYFP. Va34CCR и pCDNA3.1 eYFP. H198CCR2 использовали для трансфекции иммортализованной линии эпителиальных клеток яичников китайского хомячка CHO-K1. Уровень экспрессии и внутриклеточную локализацию белковых конъюгатов Va34CCR-YFP и H198CCR2-YFP в трансфицированных клетках определяли с помощью прижизненной флуоресцентной микроскопии после обработки клеток специфическими красителями.

Результаты типичного эксперимента представлены на рис. 4. Сравнение собственного свечения YFP-конъюгатов Va34CCR и H198CCR2 с окрашиванием клеток CellBrite Red однозначно определяет локализацию экспрессированных белков в цитоплазматической мембране. При этом уровень экспрессии полноразмерного белка H198CCR2 воспроизводимо наблюдался ниже уровня экспрессии мембранного фрагмента TM1–TM7 белка Va34CCR.

Определение фотоэлектрической активности экспрессированных родопсинов Va34CCR и H198CCR2. На рис. 5 показаны результаты экс-

периментов с клетками CHO-K1, трансфицированными плазмидами pCDNA3.1 eYFP. Va34CCR и pCDNA3.1 eYFP. H198CCR2.

В клетках, экспрессирующих H198CCR2, включение света с длиной волны 490 нм при отсутствии проходящего света при мембранном потенциале -20 мВ не вызывало появление выраженного входящего или выходящего тока, I_{98} (рис. 5, *a*), либо же этот ток находился на уровне шума. Поэтому исследования зависимости тока от интенсивности и мембранного потенциала провести не удалось.

В клетках, экспрессирующих Va34CCR, включение света с длиной волны 490 нм при отсутствии проходящего света при мембранном потенциале -20 мВ вызывало появление входящего тока, I_{34} (рис. 5, *б*), который при значениях интенсивности света от 0,67 мВт/мм² и выше имел выраженную пиковую компоненту, инактивирующуюся в течение 20–65 мс, и стационарную компоненту (плато). Среднее значение постоянной времени для инактивации пикового I_{34} при потенциале -60 мВ составило $11,3 \pm 0,78$ мс ($n = 14$). Среднее значение деактивации тока плато I_{34} при выключении света составило $25,5 \pm 2,5$ мс ($n = 14$). Наблюдаемая зависимость может быть объяснена десенситизацией каналов, образованных белком Va34CCR.

Амплитуда пикового тока и тока плато I_{34} имели позитивную зависимость от интенсивно-

сти света 490 нм вплоть до значения 2,8 мВт/мм². При большем увеличении интенсивности света наблюдали снижение амплитуды пикового тока (рис. 5, б и в). При отрицательных значениях мембранного потенциала как пиковый ток, так и ток плато имеют входящее направление. При переходе через 0 мВ и положительных значениях мембранного потенциала направление тока меняется на выходящее (рис. 5, г). Таким образом, 0 мВ является реверсивным потенциалом для тока I_{34} при экспериментальных условиях, указанных в разделе «Материалы и методы».

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

С расширением оптогенетических исследований существенно возрастает потребность в увеличении разнообразия функциональных характеристик канальных родопсинов для решения различных экспериментальных задач. Именно поэтому в поисках новых генов-кандидатов для оптогенетики исследователи по-прежнему обращаются к анализу микроводорослей Chlorophyta, огромной группы фототрофных организмов, отличающейся многообразием форм и сред обитания. По данным на 2021 год [6], при тестировании 56 генов CCR Chlorophyta (из 164 идентифицированных) функциональная активность была обнаружена у 40 генов; также появились первые данные об идентификации и функциональной активности генов анионных канальных родопсинов (ACR) у зеленых водорослей [11]. Мы посчитали актуальным проанализировать гены канальных родопсинов природных изолятов микроводорослей родов *Haematococcus* и *Bracteacoccus* из Беломорского бассейна и определить функциональную активность их белковых продуктов.

Ранее мы идентифицировали 2 негомолочных CCR-гена в микроводоросли *H. lacustris* NAMSU-BM-7/15 (*98CCR1* и *98CCR1-1*), однако при экспрессионном анализе был получен и охарактеризован полноразмерный транскрипт H198CCR2, не являющийся продуктом ни одного из вышеперечисленных генов. Таким образом, с помощью быстрой амплификации концов кДНК (RACE) при использовании вырожденных праймеров нам удалось обнаружить третий CCR-ген *H. lacustris* NAMSU-BM-7/15.

Поскольку на данный момент в базе данных GenBank депонированы уже 7 предсказанных CCR-генов *H. lacustris*, представлялось актуальным определить гомологи генов *98CCR1-1*, *98CCR1* и *98CCR2*, идентифицированных нами в штамме *H. lacustris* NAMSU-BM-7/15. По нашим данным, ген *98CCR1-1* картируется в единственном участ-

ке генома, содержащем ген (предположительно) канального родопсина (GenBank: GFH21497). Ген *98CCR1* проявляет одинаковую гомологию (85% идентичности при 95% покрытии последовательности) с двумя областями, содержащими гены канального опсина 1 (GenBank: GFH25618 и GFH12230). Ген *98CCR2* и, соответственно, транскрипт H198CCR2 картируются в обширной области 8 т.п.н. контига BLLF01000737, кодирующей ген канального опсина 1 (GenBank: GFH14526). Однако, что примечательно, открытая рамка считывания H198CCR2 не соответствует модельной сборке белка GFH14526. На основании этих результатов мы делаем вывод, что нативный транскрипт H198CCR2 является одним из вариантов альтернативного сплайсинга.

С учетом этого факта для сравнительного анализа белкового продукта транскрипта H198CCR2 мы использовали нативные CCR-транскрипты *Haematococcus*, идентифицированные в транскриптомах или полученные гомологичным клонированием (рис. 1). При этом обращает на себя внимание, что полноразмерный транскрипт H198CCR2 кодирует консервативный мембранный фрагмент TM1–TM7 с коротким Ser-обогащенным гидрофильным участком общим размером 350 а.о. В противоположность этому, все нативные CCR-транскрипты, а также 5 из 6 предсказанных полноразмерных CCR-генов *H. lacustris* кодируют гигантские белки размером ~700 а.о., включающие цитозольные последовательности. Примечательно, что идентифицированный нами H198CCR2 является продуктом единственного «короткого» предсказанного гена (GenBank: GFH14526). Остается невыясненным, почему доминирующий CCR-белок *H. lacustris* NAMSU-BM-7/15 содержит только мембранный фрагмент TM1–TM7, а также при каких условиях происходит экспрессия полноразмерных CCR-белков с регуляторными цитозольными участками [14]. Мембранный интегральный белок H198CCR2 содержит все функционально значимые аминокислотные остатки, характерные для CCR-белков, и образует димеры, однако не обнаруживает фотоэлектрической активности при гетерологичной экспрессии в животных клетках в стандартных условиях (рис. 5, а). Пока мы не исключаем, что у белка H198CCR2, возможно, иные параметры для генерации фототоков (спектр поглощения, pH), однако отметим, что у его ближайшего гомолога и единственного тестированного CCR-белка *H. lacustris*, HpChR1 (85% идентичности), фотоэлектрической активности также не наблюдалось [9]. Следует добавить, что из CCR-транскриптов *Haematococcus* только для транскрипта из *Haematococcus droebakensis* подтверждена функциональная активность его белкового продукта, HdChR [10].

Несомненный интерес представляет продукт гена *34CCR*, *Va34CCR* – первый идентифицированный канальный родопсин у микроводорослей рода *Bracteacoccus*. Нам удалось получить 5'-концевой фрагмент транскрипта ССР-гена *B. aggregatus* NAMSU-VM-5/15, который кодирует мембранный фрагмент ТМ1–ТМ7 и короткий *Lys*-обогащенный участок, не имеющий гомологии. Белок *Va34CCR* демонстрирует невысокий уровень гомологии с канальными родопсинами *Chlorophyta*: ближайшим гомологом является *CrChR2 C. reinhardtii* (59% идентичности). По результатам 3Д-моделирования, белок *Va34CCR* имеет трансмембранную локализацию и образует гомодимеры, что характерно для канальных родопсинов (рис. 3). Все известные ССР-транскрипты *Chlamydomonas* кодируют белки размером 650–750 а.о., содержащие цитозольный фрагмент наряду с мембранным ТМ1–ТМ7 [9]. Вероятно, полноразмерный продукт *Va34CCR* также относится к этому классу белков.

При гетерологичной экспрессии ТМ1–ТМ7-фрагмента белка *Va34CCR* (1–295 а.о.) в культуре клеток СНО-К1 наблюдается его эффективное накопление в цитоплазматической мембране (рис. 4). Мы также выполнили электрофизиологические эксперименты с использованием техники пэтч-кламп и показали, что в клетках, экспрессирующих *Va34CCR*, происходит генерация тока (I_{34}) в ответ на включение света с длиной волны 490 нм (рис. 5, б–г).

Поскольку спектр действия родопсина *Va34CCR* на данном этапе не изучен, полученные результаты мы рассматриваем как предварительные, и их сравнение с имеющимися детальными электрофизиологическими характеристиками канальных родопсинов *CrChR1* и *CrChR2* возможно лишь отчасти. Тем не менее очевидно, что светоиндуцируемый ток I_{34} существенно ближе по своим свойствам к току, генерируемому *CrChR2*, по сравнению с током родопсина *CrChR1*. Как и ток *CrChR2* [13], I_{34} подвержен десенситизации (инактивации), то есть при постоянной подаче возбуждающего света он самопроизвольно ослабевает, выходя в течение нескольких десятков миллисекунд на стационарный уровень. Напротив, для тока, генерируемого *CrChR1*, десенситизация нехарактерна [12].

Данные, опубликованные в недавней работе Hososhima et al. [15], позволяют сравнить амплитуду и кинетические характеристики тока, генерируемого *CrChR2*, с I_{34} , учитывая, что данные по *CrChR2* были получены с использованием гетерологической экспрессии в другой клеточной линии (ND7/23). Клетки, экспрессирующие *CrChR2*, при облучении светом с интенсивностью 2,7 мВт/мм² генерировали при поддерживаемом потенциале –60 мВ ток с пиковой плот-

ностью $32 \pm 3,2$ пА/пФ, снижающийся до уровня плато $12 \pm 1,1$ пА/пФ [15]. В наших экспериментах свет практически такой же интенсивности (2,8 мВт/мм²) подавали при поддерживаемом потенциале –20 мВ, однако, учитывая известную вольтамперную зависимость I_{34} (рис. 5, г), можно приблизительно оценить значение пикового I_{34} при –60 мВ в 3,7 пА/пФ, а тока уровня плато – в 1,06 пА/пФ. Таким образом, *CrChR2* способен генерировать приблизительно в 10 раз больший ток, чем *Va34CCR*, при облучении светом одинаковой интенсивности с длиной волны 470 нм и 490 нм соответственно. С другой стороны, величина тока плато составляет приблизительно 37,5% от величины пикового тока в случае *CrChR2* [15] и 35% – для I_{34} , то есть по этому параметру токи *CrChR2* и *Va34CCR* практически не различаются.

Кинетические характеристики I_{34} сравнимы с характеристиками тока *CrChR2*. Постоянная времени деактивации тока плато, происходящей после выключения света 490 нм, для I_{34} составила $25,5 \pm 2,5$ мс ($n = 14$), в то время как ток *CrChR2*, по данным Hososhima et al. [15], деактивируется в 2 раза быстрее ($\tau_{\text{off}} = 12,2 \pm 0,69$ мс). Инактивация пиковой компоненты I_{34} , напротив, происходит в несколько раз быстрее ($\tau = 11,3 \pm 0,78$ мс; $n = 14$), чем можно приблизительно оценить для тока *CrChR2* (~63 мс).

Ток, генерируемый *CrChR2*, имеет потенциал реверсии ~0 мВ при ионном составе внешней среды, близком к использованному в нашем исследовании [13]. При этом если при потенциалах, близких к 0 мВ (от –40 до 40 мВ), вольтамперная зависимость этого тока близка к линейной, то при более сильной гиперполяризации зависимость входящего тока от потенциала становится близка к экспоненциальной. Точно такой же тип вольтамперной зависимости характерен и для I_{34} . В отличие от тока *CrChR1*, имеющего исключительно протонную природу, ток, генерируемый *CrChR2*, является смешанным катионным током, что обусловлено неизбирательной проницаемостью *CrChR2* для различных катионов, в том числе бивалентных [13]. Именно этим обусловлен нулевой потенциал реверсии данного тока в стандартных физиологических условиях. Дальнейшие эксперименты с вариациями ионного состава внешнего и внутриклеточного раствора позволят выяснить, является ли ток I_{34} также неселективным катионным током.

Вклад авторов. Е.С. Лобакова, О.В. Карпова, Д.В. Абрамочкин – концепция и руководство работой; Е.Н. Виноградова, О.В. Карпова, А.М. Мойсенович, О.Б. Пустовит, А.А. Рамонова – проведение экспериментов; Е.С. Лобакова, О.В. Карпова, Д.В. Абрамочкин – обсуждение результатов иссле-

дования; О.В. Карпова, Д.В. Абрамочкин – написание текста; Е.С. Лобакова, Д.В. Абрамочкин – редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках соглашения № 075-15-2021-1396 от 26.10.2021 г. Работы по ДНК-секвенированию проведены в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

Благодарности. Авторы выражают благодарность Т.А. Федоренко (МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва) за предоставление культур и рекомендации по выращиванию, Центру старения МФТИ

(г. Долгопрудный) за предоставленный экспрессионный вектор рсDNA3.1 eYFP, а также Е.Г. Максимова (МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва) за предоставленный измеритель интенсивности излучения. В работе использовали оборудование, приобретенное в рамках «Программы развития Московского университета до 2020 года», и оборудование ЦКП МГУ имени М.В. Ломоносова.

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

1. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., and Spudich, J. L. (2022) Emerging diversity of channelrhodopsins and their structure-function relationships, *Front. Cell. Neurosci.*, **15**, 800313, <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.800313>.
2. Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., Der, A., Keszthelyi, L., and Nultsch, W. (1992) Photoelectric responses in phototactic flagellated algae measured in cell suspension, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **13**, 119-134, [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(92\)85051-U](https://doi.org/10.1016/1011-1344(92)85051-U).
3. Sineshchekov, O. A., Jung, K.-H., and Spudich, J. L. (2002) Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 8689-8694, <https://doi.org/10.1073/pnas.122243399>.
4. Govorunova, E. G., Jung, K.-W., Sineshchekov, O. A., and Spudich, J. L. (2004) *Chlamydomonas* sensory rhodopsins A and B: cellular content and role in photophobic responses, *Biophys. J.*, **86**, 2342-2349, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74291-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74291-5).
5. Deisseroth, K. (2015) Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience, *Nat. Neurosci.*, **18**, 1213-1225, <https://doi.org/10.1038/nn.4091>.
6. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Li, H., Wang, Y., Brown, L. S., Palmateer, A., Melkonian, M., Cheng, S., Carpenter, E., Patterson, J., Wong, G. K., and Spudich, J. L. (2021) Cation and anion channelrhodopsins: sequence motifs and taxonomic distribution, *mBio*, **12**, e0165621, <https://doi.org/10.1128/mBio.01656-21>.
7. Карпова О. В., Виноградова Е. Н., Лобакова Е. С. (2022) Идентификация генов канальных родопсинов в зеленых и криптофитовых водорослях Белого и Черного морей, *Биохимия*, **87**, 1492-1504, <https://doi.org/10.31857/S0320972522100141>.
8. Galletta, L. J., Haggie, P. M., and Verkman, A. S. (2001) Green fluorescent protein-based halide indicators with improved chloride and iodide affinities, *FEBS Lett.*, **499**, 220-224, [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02561-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02561-3).
9. Hou, S. Y., Govorunova, E. G., Ntefidou, M., Lane, C. E., Spudich, E. N., Sineshchekov, O. A., Spudich, J. L. (2012) Diversity of *Chlamydomonas* channelrhodopsins, *Photochem. Photobiol.*, **88**, 119-128, <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.01027.x>.
10. Klapoetke, N. C., Murata, Y., Kim, S. S., Pulver, S. R., Birdsey-Benson, A., Cho, Y. K., Morimoto, T. K., Chuong, A. S., Carpenter, E. J., Tian, Z., Wang, J., Xie, Y., Yan, Z., Zhang, Y., Chow, B. Y., Surek, B., Melkonian, M., Jayaraman, V., Constantine-Paton, M., Wong, G. K., and Boyden, E. S. (2014) Independent optical excitation of distinct neural populations, *Nat. Methods*, **11**, 338-346, <https://doi.org/10.1038/nmeth.2836>.
11. Rozenberg, A., Oppermann, J., Wietek, J., Fernandez Lahore, R. G., Sandaa, R. A., Bratbak, G., Hegemann, P., and Béjà, O. (2020) Lateral gene transfer of anion-conducting channelrhodopsins between green algae and giant viruses, *Curr. Biol.*, **30**, 4910-4920, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.09.056>.
12. Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A. M., Bamberg, E., and Hegemann, P. (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae, *Science*, **296**, 2395-2398, <https://doi.org/10.1126/science.1072068>.
13. Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P., and Bamberg E. (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 13940-13945, <https://doi.org/10.1073/pnas.1936192100>.

14. Говорунова Е. Г., Синещеков О. А. (2023) Канальные родопсины: от фототаксиса к оптогенетике, *Биохимия*, **88**, 1880-1897, <https://doi.org/10.1134/S000629792310015>.
15. Hososhima, S., Ueno, S., Okado, S., Inoue, K., and Konno, M. (2023) A light-gated cation channel with high reactivity to weak light, *Sci. Rep.*, **13**, 7625, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34687-7>.

FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE CHANNEL RHODOPSIN GENES FROM THE GREEN ALGAE OF THE WHITE SEA BASIN

O. V. Karpova^{1*}, E. N. Vinogradova^{1,2}, A. M. Moisenovich¹, O. B. Pustovit¹,
A. A. Ramonova¹, D. V. Abramochkin¹, and E. S. Lobakova¹

¹ *Biology Department, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: olgakarpova@ymail.com*

² *Genome Center, National Research Center "Kurtchatov Institute", 123182 Moscow, Russia*

Optogenetics as the method of light-controlled regulation of cellular processes is based on the use of the channel rhodopsins that directly generate photoinduced currents. The largest number of channel rhodopsin genes has been identified in the green microalgae Chlorophyta, and the demand for increasing the number of functionally characterized channel rhodopsins and the diversity of their photochemical parameters keeps growing. We performed the expression analysis of cation channel rhodopsin (CCR) genes in natural isolates of microalgae of the genera *Haematococcus* and *Bracteacoccus* from the unique Polar Circle region. The identified full-length CCR transcript of *H. lacustris* is the product of alternative splicing and encodes the H198CCR2 protein with no photochemical activity. The 5'-partial fragment of the *B. aggregatus* CCR transcript encodes the Ba34CCR protein containing a conserved TM1–TM7 membrane domain and a short cytosolic fragment. Upon heterologous expression of the TM1–TM7 fragment in CHO-K1 cell culture, light-dependent current generation was observed, and its parameters correspond to the characteristics of the CCR. The first discovered functional channel rhodopsin of *Bracteacoccus* has no close CCR homologs and may be of interest as a candidate for optogenetics.

Keywords: channel rhodopsins, green algae, photo-induced current, optogenetics