

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ КАНАЛЬНЫХ РОДОПСИНОВ В ЗЕЛЕННЫХ И КРИПТОФИТОВЫХ ВОДОРΟΣЛЯХ БЕЛОГО И ЧЕРНОГО МОРЕЙ

© 2022 О.В. Карпова^{1*}, Е.Н. Виноградова^{1,2}, Е.С. Лобакова¹

¹ Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: karпова_ov@mail.bio.msu.ru

² НИЦ «Курчатовский институт», НБИКС Геномный центр, 123182 Москва, Россия

Поступила в редакцию 06.07.2022

После доработки 24.08.2022

Принята к публикации 24.08.2022

Канальные родопсины зеленых (Chlorophyta) и криптофитовых (Cryptophyta) водорослей при фотоактивации способны модулировать мембранный потенциал клетки и благодаря этому уникальному свойству широко применяются в оптогенетике – современном методе светозависимой регуляции биологических процессов. Для поиска новых генов, перспективных для оптогенетики, мы разработали ПЦР-тесты на канальные родопсины. Были проанализированы 6 беломорских изолятов зеленых водорослей, принадлежащих к родам *Haematococcus* и *Bracteacoccus*, а также 2 образца криптофитовых водорослей *Rhodomonas* sp. из районов Белого и Черного морей. Наш метод позволил успешно выявить ранее идентифицированные канальные родопсины у водорослей рода *Haematococcus*, а также впервые обнаружить гены катионных канальных родопсинов в водорослях рода *Bracteacoccus*. Также идентифицированы отдаленно гомологичные гены анионных канальных родопсинов в образцах *Rhodomonas* sp. из районов Белого и Черного морей. Представленные результаты показывают, что разработанные ПЦР-тесты могут быть полезным инструментом для поиска уникальных генов родопсинов среди представителей Chlorophyta и Cryptophyta в широком диапазоне внутригрупповой гомологии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: катионные канальные родопсины; анионные канальные родопсины; зеленые водоросли; криптофитовые водоросли; оптогенетика.

DOI: 10.31857/S0320972522100141, EDN: BDNOYX

ВВЕДЕНИЕ

Канальные родопсины выполняют функции фоторецепторов и встречаются преимущественно у водорослей, способных к фототаксису. Они относятся к семейству интегральных мембранных белков с семью трансмембранными α -спиралями (ТМ-1–ТМ-7) и ретиналем в качестве хромофора. Фотоизомеризация в ответ на поглощение света в области 400–700 нм приводит к конформационным изменениям белка, в результате которых родопсин напрямую осуществляет пассивный трансмембранный транспорт ионов по градиенту. Способность к светозависимому транспорту ионов является уникальным свойством канальных родопсинов, не известным ни для каких других природных белков [1].

Принятые сокращения: ССР – катионные канальные родопсины; АСР – анионные канальные родопсины.

* Адресат для корреспонденции.

Впервые катионные канальные родопсины (CrChR1 и CrChR2) были обнаружены в одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* [2–4]. Было показано, что CrChR1 и CrChR2 являются светоактивируемыми каналами, проницаемыми для H^+ , Na^+ , K^+ и Ca^{2+} , и вызывают деполяризацию мембраны за счет транспорта Na^+ и H^+ в клетки. Более того, посредством мембранной деполяризации при экспрессии CrChR2 в нейронах гиппокампа крысы удалось индуцировать светозависимую активацию [5]. Собственно, с этой новаторской работы 2005 г. и начинается становление оптогенетики как метода светозависимой регуляции биологических процессов путем гетерологичной экспрессии родопсинов в клетках-мишенях.

В оптогенетическом эксперименте для контроля генерации потенциалов действия в клетке должна присутствовать пара родопсинов с разными спектрами фотоактивации и разной селективностью каналов, катионных и анионных, для деполяризации и гиперполяризации

мембраны соответственно. Для деполяризации мембраны и стимуляции нейрональной активности используются катионные каналы родопсины (CCR, cation channel rhodopsin) [6]. CCR зеленых водорослей – единственные представители эукариотических родопсинов, сенсорные функции которых были экспериментально подтверждены *in vivo* [2]. Наиболее изучен CrChR2 из *C. reinhardtii* как прототип CCR – его кристаллическая структура, направленный мутагенез, механизм фотоактивации и т.д. Именно CrChR2 и его производные наиболее часто используются в оптогенетических исследованиях в качестве активирующих молекул.

Впервые гены природных анионных каналов родопсинов (ACR, anion channel rhodopsin) были идентифицированы при геномном анализе водоросли *Guillardia theta* (Cryptophyta) [7]. Оказалось, что криптофитовые GtACR1 и GtACR2 способны индуцировать фототоки до 10^3 выше, чем галородопсины, традиционно использовавшиеся для гиперполяризации мембраны и тушения нейронов [8], и, таким образом, являются идеальными кандидатами для оптогенетических исследований.

Основная сложность оптогенетического подхода заключается в подборе родопсинов для каждой данной задачи и, как следствие, в необходимости увеличения количества и функционального разнообразия идентифицированных родопсинов с уникальными характеристиками: высокой световой чувствительностью, быстрыми фотоциклами, высокой амплитудой фототока и скоростью инактивации [9]. Впечатляющие успехи оптогенетики, включая частичное восстановление зрения у человека после родопсиновой терапии [10], указывают также на возрастающий потенциал этого инновационного метода для коммерциализации. По данным 2021 г., идентифицировано около 100 генов CCR зеленых водорослей (Chlorophyceae) и по крайней мере 50 генов ACR криптофитовых (Cryptophyceae), только небольшая часть которых охарактеризована [11]. В открытом доступе гены-кандидаты для оптогенетики представлены преимущественно в виде синтетических продуктов, лицензированных для дальнейшего применения. Все это свидетельствует о важности и необходимости разрабатывать собственную базу для оптогенетических исследований и в первую очередь искать продуцентов новых уникальных родопсинов.

С этой целью мы разработали ПЦР-тесты для идентификации генов канальных родопсинов Chlorophyta и Cryptophyta и проанализировали 6 штаммов зеленых водорос-

лей беломорского бассейна из коллекции кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, а также образцы криптофитовых водорослей (Белое и Черное моря). Мы обнаружили и частично охарактеризовали гены CCR (37CCR, 98CCR1, 98CCR1-1) в двух штаммах *Haematococcus lacustris* (NAMSU-BM-6/13 и NAMSU-BM-7/15) и в штамме *Bracteacoccus aggregatus* NAMSU-BM-5/15 (34CCR), причем данные о наличии генов CCR в водорослях рода *Bracteacoccus* приводятся впервые. В черноморском изоляте криптофитовых водорослей удалось идентифицировать по одному гену CCR и ACR (*CryCCR*, *CryACR*), в то время как в природном образце криптофитовых беломорского бассейна обнаружен ген ACR, *RhoACR*. Обсуждаются возможности геномного анализа неохарактеризованных объектов водорослей и применение данных ПЦР для дальнейшего изучения генов родопсинов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Происхождение штаммов зеленых водорослей (Chlorophyta) и природных образцов криптофитовых водорослей (Cryptophyta). Сбор проб микроводорослей осуществлялся в 2011–2016 гг. в ходе ежегодных экспедиций кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ на полуостров Киндо карельского берега Ругозерской губы Кандалакшского залива Белого моря, в окрестностях Беломорской биологической станции (ББС МГУ) им. Н.А. Перцова в бухте Пробкиной Губки (С.Ш. 66°32'24"; В.Д. 33°11'2").

Chlorophyta. Штамм *H. lacustris* NAMSU-BM-7/15 был изолирован из пресноводного образца, полученного на территории ББС МГУ. Все остальные исследованные штаммы *H. lacustris* (IPPAS Н-2018; NAMSU-BM-6/13; NAMSU-BM-K/15; NAMSU-BM-4/13) были получены из литоральных образцов воды разной солености (0–25‰) [12, 13].

Штамм *B. aggregatus* NAMSU-BM-5/15 был изолирован из образца озерной воды (6‰) [13]. В дополнение к беломорскому образцу был проанализирован штамм *Bracteacoccus* sp. SykoA Ch-040-10 (почва, Приполярный Урал) из Коллекции живых штаммов микроводорослей Института биологии Коми НЦ УРО РАН.

Cryptophyta. Образцы некультивируемых форм криптоноад получали из меромиктического озера Кисло-Сладкое на побережье Кандалакшского залива Белого моря (глубина – 3,6 м, соленость – свыше 24‰). В период размножения водорослей (июль–август) боль-

шие объемы озерной воды подвергали центрифугированию, клеточные осадки обрабатывали реагентом RNeasy (ThermoFisher Scientific, США), после чего хранили при -20°C .

Обогащенная культура черноморского изолята криптофитовых *Rhodomonas* sp. OVPo-2021a (штамм IBSS-59) была получена из коллекции ФИЦ ИнБЮМ РАН, Севастополь.

Условия культивирования. Chlorophyta. Альгологически чистые культуры *H. lacustris* и *B. aggregatus* были получены многократными пересевами на твердой среде BG-11 [14], содержащей 2% агара, и поддерживались в жидкой среде BG-11 при 15°C в культивационной камере («Liebherr», Германия) при освещении белым светом 20 мкмоль квантов ФАР·м⁻²·с⁻¹ [14]. Для получения активно растущих культур штаммы зеленых водорослей пересевали в свежую среду BG-11 и инкубировали 1–2 недели при 25°C и освещении белым светом 40 мкмоль квантов ФАР·м⁻²·с⁻¹.

Cryptophyta. Культуру черноморского изолята *Rhodomonas* sp. OVPo-2021a поддерживали в среде Уолна на основе стерильной морской воды [15] при $12\text{--}15^{\circ}\text{C}$ в культивационной камере при освещении белым светом 20 мкмоль квантов ФАР·м⁻²·с⁻¹.

Выделение геномной ДНК из зеленых водорослей и образцов криптофитовых водорослей проводили с использованием набора для выделения ДНК FastDNA («MP Biomedicals», США). Для экстракции ДНК образцы (около 100 мг сырого веса) лизировали механическим

разрушением в дезинтеграторе FastPrep-24™ 5G в присутствии микробусин Lysing Matrix type A («MP Biomedicals»). Препараты геномной ДНК, выделенные из образцов криптофитовых водорослей, были проанализированы по 18S-рДНК для определения таксономической принадлежности.

Разработка ПЦР-тестов для определения генов канальных родопсинов. Подбор ПЦР-праймеров производился для высококонсервативных участков генов канальных родопсинов на основании гомологии последовательностей, опубликованных ранее (Chlorophyta) или выявленных нами при анализе транскриптомных баз данных *Rhodomonas* (Cryptophyta), MMETSP1091 и MMETSP1389 [16].

Уровень гомологии определяли с помощью метода множественного выравнивания последовательностей CLUSTAL Omega EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk). Для поиска генов канальных родопсинов в базах данных в качестве мишеней использовали короткие консервативные последовательности в алгоритме tBLASTn (NCBI BLAST).

Подбор и анализ ПЦР-праймеров проводили с помощью программы OligoAnalyzer («Integrated DNA Technologies», США).

ПЦР и анализ ПЦР-продуктов. ПЦР выполняли на образцах геномной ДНК (до 10 нг на пробу) с использованием препарата DreamTaq PCR Master Mix («ThermoFisher Scientific», США). Продукты ПЦР фракционировали гель-электрофорезом в 1%-ной ага-

Таблица 1. Референтные гены канальных родопсинов Chlorophyta и Cryptophyta

Тип родопсина	Организм	Наименование гена	GenBank	Источник
Катионные канальные родопсины, CCR	Chlorophyta			
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	сенсорный опсин В, <i>CrChR2</i>	AF508966	[2]
	<i>Haematococcus pluvialis (lacustris)</i>	канальный опсин 1, <i>HpChR1</i>	JN596950	
	Cryptophyta			
	<i>Guillardia theta</i> CCMP2712	катионный канальный родопсин, <i>GiCCR1</i>	KU761994	[18]
		катионный канальный родопсин, <i>GiCCR2</i>	KU761992	
катионный канальный родопсин, <i>GiCCR3</i>		KU761993		
Анионные канальные родопсины, ACR	синтетический ген <i>ACR1</i>		KP171708	[7]
	синтетический ген <i>ACR2</i>		KP171709	

Таблица 2. ПЦР-праймеры, использованные в работе

Наименование	5'→3' последовательность	Источник*
18S 381F	TCCGGAGAGGGAGCMTGAGA	[19]
18S 1204R	CCCGYGTGAGTCAAATTA	
CCR_fwd	YGGHTGGGARGAGRTBTACGT	
CCR_rev	CCCTTGGGMACDGTGTGGTA	
RhACR4_fwd	TGGGARGCMGTBTAYCTKCC	
RhACR6_rev	CGTCCAGGACTCGGAACACAGTG	
RhACR11_fwd	TGGCTYATCACNTGYCCSATYATGCT	
RhACR12_rev	GATGATSCCGTACASGTTCTTGCA	
RhACR13_rev	GATGATYCCRTAGAKGTTCTTGCA	
RhACR14_rev	GATGATGCCGTATGTGTTCTTGCA	
RhCCR_fwd	GARCARAAYATGCTYGGDGTNTTCATC	
RhCCR_rev	GAACCTTSTGGAASTCCTCYTCGTC	

* Все CCR- и ACR-специфические праймеры разработаны в данной статье.

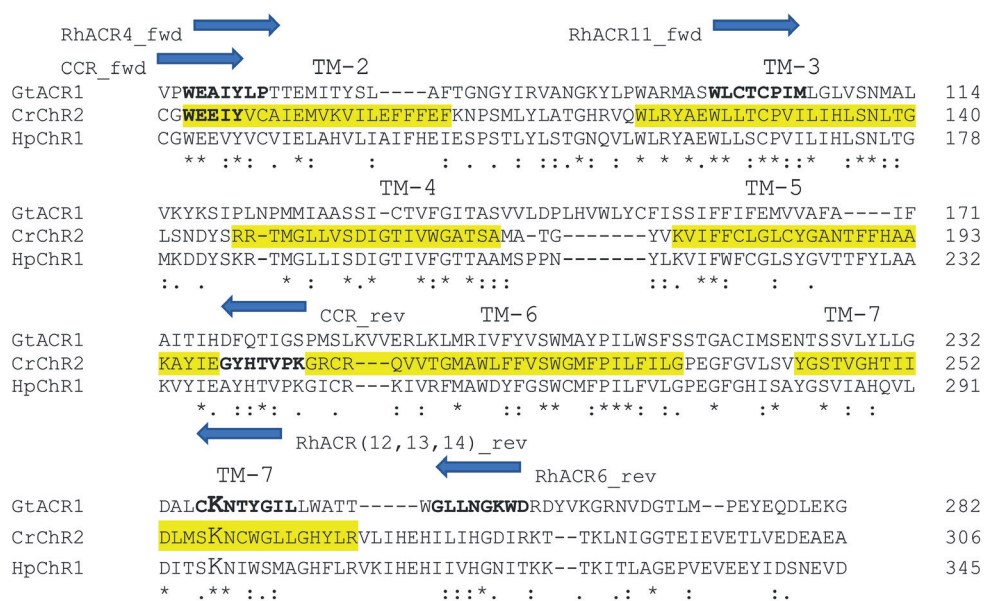


Рис. 1. Локализация ПЦР-праймеров в области консервативного функционального фрагмента TM-1–TM-7 канальных родопсинов Chlorophyta (CrChR2, HpChR1) и Cryptophyta (GtACR1). Трансмембранные спирали TM-2–TM-7 определены с помощью программы NCBI Conserved Domain Search (выделены желтым цветом). Участок присоединения ретиналя в TM-7 выделен крупным шрифтом. Точная локализация праймеров показана аминокислотными остатками, выделенными жирным шрифтом

розе, фрагменты ДНК элюировали из геля с помощью набора Cleanup Mini («Евроген», Россия), после чего анализировали секвенированием по методу Сэнгера (ЦПК Геном при ИМБ РАН, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поиск генов катионных канальных родопсинов, CCR, в микроводорослях Chlorophyta. Для анализа генов родопсинов из коллекции зеле-

ных водорослей были отобраны штаммы с фотосенсорными органеллами как потенциальные носители подобных генов [17]. Среди них 5 изолятов рода *Haematococcus* и 2 штамма рода *Bracteacoccus*.

Для разработки ПЦР-теста на родопсины CCR в качестве референтных генов мы использовали ген *HpChR1*, кодирующий канальный опсин 1 из *Haematococcus pluvialis (lacustris)* и ген *CrChR2*, кодирующий уже упоминавшийся ранее сенсорный опсин В из *C. reinhardtii* (табл. 1 и 2).

На рис. 1 показано выравнивание аминокислотных последовательностей *HpChR1* и *CrChR2* в области функционального участка родопсина, включающего трансмембранные спирали ТМ-1–ТМ-7, и расположение рабочих праймеров (CCR_fwd; CCR_rev) относительно консервативных доменов.

Результаты типичного ПЦР-анализа родопсинов CCR на образцах геномной ДНК приведены на рис. 2. Очевидные различия в ПЦР-спектрах между родами *Haematococcus* и *Bracteacoccus* указывают на то, что, предположительно, геномы анализированных штаммов *Haematococcus* содержат по 2 гена CCR, в то время как в штамме рода *Bracteacoccus* присутствует единственный ген CCR.

Полученные ПЦР-фрагменты генов CCR штаммов *Haematococcus* и *Bracteacoccus* были отсекувенированы (GenBank: ON643073–643077; табл. 3), и определены их ближайшие гомологи (табл. 3). Фрагменты генов *37CCR* и *98CCR1* размером около 800 п.н. из двух изолятов *H. lacustris* оказались практически идентичны ранее охарактеризованному гену родопсина 1 из *H. pluvialis*, *HpChR1* (GenBank: JN596950; 95% идентичности). А вот фрагмент гена *98CCR1-1* размером около 1200 п.н. из *H. lacustris* (NAMSU-BM-7/15) не имеет гомологии с *HpChR1*, но идентичен другому гену, предположительно, канального родопсина из *H. lacustris* (GenBank: MH845643; 98% идентичности). Ближайшим охарактеризованным гомологом гена *98CCR1-1* является ген канального опсина 2 из *Chlamydomonas raudensis* (GenBank: JN596949; 83% идентичности). Гены *34CCR* и *40CCR* – первые CCR, обнаруженные в микроводоросли рода *Bracteacoccus*, – еще менее гомологичны своему ближайшему гомологу, гену опсина В из *C. reinhardtii*, *CrChR2* (GenBank: AF508966; 77% идентичности).

Обращает на себя внимание сложная структура генов CCR из штаммов *Haematococcus* и *Bracteacoccus*: так, например, во фрагменте гена *98CCR1-1* четко определяются границы 4-х экзонов и 3-х интронов, что отражается на

протяженности гомологичной последовательности (37% длины фрагмента). В случае фрагмента гена *34CCR* обнаруживаются 2 области гомологии с *CrChR2*, которые составляют всего 20% его длины. При этом, по предварительным данным нашего анализа транскрипта *34CCR*, указанный фрагмент гена *34CCR* включает по 2 полных экзона и интрона, а также по неполному экзону и интрону.

При анализе транслированных аминокислотных последовательностей фрагментов найденных генов обнаруживаются консервативные трансмембранные участки ТМ-2–ТМ-5, характерные для родопсинов (рис. 3).

Поиск генов канальных родопсинов в микроводорослях Cryptophyta. В криптофитовых микроводорослях идентифицированы гены канальных родопсинов обоих типов, CCR и ACR, что делает эти микроорганизмы уникальным ресурсом для развития инструментальной базы оптогенетики [1]. Однако работа с этим объектом имеет специфические особенности из-за небольшой распространенности в природе и сложностей (или невозможности) культивирования. Именно по этим причинам впервые о наличии свыше 40 генов канальных родопсинов было предсказано на основании анализа генома *G. theta* [7], первого представителя Cryptophyta, чей геном был полностью

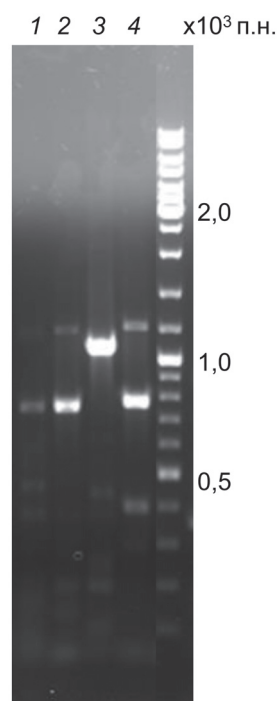


Рис. 2. ПЦР-анализ генов катионных канальных родопсинов в штаммах зеленых водорослей. Дорожки: 1 – *Haematococcus lacustris* (NAMSU-BM-4/13); 2 – *H. lacustris* (NAMSU-BM-6/13); 3 – *Bracteacoccus aggregatus* (NAMSU-BM-5/15); 4 – *H. lacustris* (NAMSU-BM-7/15)

Таблица 3. Идентифицированные гены катионных канальных родопсинов Chlorophyta

Наименование	Организм	GenBank	Гомолог		
			Наименование	Идентичность/ протяженность гомологии, %	GenBank
98CCR1-1, фрагмент гена	<i>H. lacustris</i> NAMSU-BM-7/15	ON643074	<i>H. lacustris</i> канальный родопсин (предположительно)	98/37	MH845643
98CCR1, фрагмент гена		ON643073	<i>H. pluvialis (lacustris)</i> канальный опсин 1, <i>HpChR1</i>	95/45	JN596950
37CCR, фрагмент гена	<i>H. lacustris</i> NAMSU-BM-6/13	ON643075		95/50	JN596950
34CCR, фрагмент гена	<i>B. aggregatus</i> NAMSU-BM-5/15	ON643076	<i>C. reinhardtii</i> сенсорный опсин В, <i>CrChR2</i>	77/20	AF508966
40CCR, фрагмент гена	<i>Bracteacoccus sp.</i> SykoA Ch-040-10	ON643077		75/19	AF508966

секвенирован. И до настоящего времени используется единственный подход к поиску родопсинов у криптофитовых водорослей: анализ данных по геномам/транскриптомам родственных видов с последующим синтезом генов-кандидатов и их гетерологичной экспрессией для проверки фотохимической активности. В своей работе мы также применили методы биоинформатики, но при создании ПЦР-систем для анализа генов родопсинов в неохарактеризованных природных образцах Cryptophyta.

В качестве объектов были использованы изоляты Cryptophyta – природный образец *Rhodomonas sp.* беломорского бассейна (не-

культивируемая форма) и обогащенная культура (поддерживаемая в лабораторных условиях) черноморской криптонады *Rhodomonas sp.* OVPo-2021a. Предварительный 18S-анализ показал, что беломорский изолят идентичен *Rhodomonas sp.*, ранее обнаруженному в том же районе (GenBank: JN934672; [20]).

К началу нашего проекта были опубликованы данные по родопсинам ACR и CCR *G. theta* и ряда лабораторных штаммов *Rhodomonas*: аминокислотные и кодон-оптимизированные нуклеотидные последовательности функциональных участков родопсинов TM-1–TM-7 [7, 18]. Этой информации, очевидно, было недостаточно для анализа высокогомологичных последо-

	---TM-2	TM-3	
37CCR	-----AQVLI AIFHEIESPSTMYLSTGNQVLWSX-YGEWLLSCPVI LIHLSNLTGR		50
98CCR1	-----AHVLI AIFHEIESPSTLYLSTGNQVLWLR-YAEWLLSCPVI LIHLSNLTGM		50
HpChR1	EVYVCVIELAHVLI AIFHEIESPSTLYLSTGNQVLWLR-YAEWLLSCPVI LIHLSNLTGM		179
CrChR2	EYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLR-YAEWLLTCPVILIHLSNLTGL		141
98CCR1-1	-----IYHEFDHPCTLYLSTGNWILWLR-YGEWLLTCPVILIHLSNITGL		44
34CCR	-----CTVTQVNGVVPWLR-YGEWLLTCPVILIHLSNLTGL		36
40CCR	-----TPLAQNTASGCSPGPVI LIHLSNLTGL		27
		.. *****:**	
	TM-4	TM-5	
37CCR	KDEXCKRTMGLGISDIGPMVHGTSEHMSPANYRKVIVRFWGLWY-----		94
98CCR1	KDDYSKRTMGLLIRDIGTIVSGTTAAMSPPNYLKV-----		85
HpChR1	KDDYSKRTMGLLISDIGTIVFGTTAAMSPPNYLKVIFWFCGLSYGVTTFYLAAKVYIEAY		239
CrChR2	SNDYSRRTMGLLVSDIGTIVWGATSAMA-TGYVKVIFFCGLGCLCYGANTFFHAAKAYIEGY		200
98CCR1-1	KNDYNKRTMWLLVSDIGCVVMGVTAALC-YDYKKWIFYCLGLCYGSNTYFHAAK-----		97
34CCR	KNNYSKRTMMLLMSDLGTIVMGITAALS-SSPIKIIFFCIGLCYGCNTWFHAAKV-----		90
40CCR	KNNYSKRTMMLLISDLGTIVMGVTSALS-ASPVKIIFFCIGLCYGCNTWFHAAKV-----		81
	.. : ** * : * : * * * : .. . *		

Рис. 3. Гомология транслированных аминокислотных последовательностей фрагментов генов 37CCR, 98CCR1, 98CCR1-1, 34CCR, 40CCR и катионных канальных родопсинов CrChR2 (*C. reinhardtii*) и HpChR1 (*H. lacustris*). Желтым цветом выделены трансмембранные спирали TM-2–TM-5

Таблица 4. Идентифицированные гены канальных родопсинов *Rhodomonas* sp. (Стурторфута)

Наименование	Организм	Происхождение	GenBank	Транскрипт	Гомолог				Источник
					Наименование	Идентичность/протяженность гомологии, %	GenBank	Транскрипт	
Гены анионных канальных родопсинов, ACR									
<i>RhACR_9525</i>	<i>Rhodomonas</i> sp. ССМР768	база данных MMETSP1091		CAMNT_0042109525	R8ACR2	79/54	MW55758		[11]
<i>RhACR_1877</i>					R1ACR_877	100/58	KX879685		[21]
<i>RhACR_6447</i>					R1ACR_447	97/63	KX879686		[22]
<i>RhACR_8927</i>					R1ACR_653	90/38	MG831193		
<i>RhACR_7741</i>					R1ACR_741	92/61	KX879687		
<i>RhACR_6367</i>					R1ACR_367	100/60	KX879684		
<i>RhACR_1591</i>					R1ACR_447	93/63	KX879686		[21]
<i>RhACR_3799</i>					R1ACR_799	100/59	KX879688		
<i>RhACR_3053</i>	R1ACR_877	99/56	KX879685						
<i>RhACR_8653</i>	R1ACR_653	100/44	MG831193		[22]				
<i>CryACR</i> , фрагмент гена	<i>Rhodomonas</i> sp. OVPo-2021a штамм IBSS-59	изолят Стурторфута, Черное море ФИЦ ИНБЮМ РАН	ON643079		R1ACR_447	95/75	APZ76716		[21]
					RhACR_1591*	83/73			
<i>RhoACR</i> , фрагмент гена	<i>Rhodomonas</i> sp.	природный образец, Белое море	ON643080		R2ACR_853	56/61	APZ76719		[21]
					RhACR_1591*	77/20			

Таблица 4 (продолжение)

Наименование	Организм	Происхождение	GenBank	Транскрипт	Гомолог			Источник
					Наименование	Идентичность/протяженность гомологии, %	GenBank	
Гены катионных канальных родопсинов, CCR								
<i>RhCCR_1959</i>				SAMNT_0042061959	100/100		MMETSP1091 DN28851_c0_g1_i1.p1	
<i>RhCCR_6333</i>				SAMNT_0042066333	92/100		MMETSP1091 DN29084_c6_g1_i1.p1	
<i>RhCCR_6679</i>		база данных MMETSP1091		SAMNT_0042106679	100/100		MMETSP1389 DN30485_c0_g1_i1.p1	
<i>RhCCR_8499</i>				SAMNT_0042108499	100/100		MMETSP1091 DN29084_c2_g1_i1.p1	[11]
<i>RhCCR_1525</i>	<i>Rhodomonas</i> sp. CCMP768			SAMNT_0049531525	100/100		MMETSP1389 DN30485_c0_g1_i1.p1	
<i>RhCCR_4213</i>				SAMNT_0049534213	100/100		MMETSP1389 DN30320_c0_g2_i1.p1	
<i>RhCCR_4967</i>		база данных MMETSP1389		SAMNT_0049494967	100/100		MMETSP1091 DN28851_c0_g1_i1.p1	
<i>RhCCR_5533</i>				SAMNT_0049495533	100/100		MMETSP1389 DN28221_c0_g1_i1.p1	
<i>CryCCR</i> , фрагмент гена	<i>Rhodomonas</i> sp. OVPo-2021a штамм IBSS-59	изолат Стурторфута, Черное море ФИЦ ИнБЮМ РАН	ON643078		58/64	ANC73518		[18]
				RhCCR_4213*	84/56			

Примечание. * обозначает транскрипты; % гомологии указан для нуклеотидных последовательностей. Все остальные гомологи идентифицированы в режиме трансляции BLASTx и являются продуктами синтетических генов.

Данные GenBank и % гомологии указаны на уровне белка.

вательностей и дизайна ПЦР-тестов, поэтому мы провели независимый поиск нативных полноразмерных транскриптов ACR и CCR в двух базах данных транскриптома *Rhodomonas* sp. CCMP768, MMETSP1091 и MMETSP1389 (The Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project; www.marinemicroeukaryotes.org).

На рис. 1 показаны области гомологии родопсина ACR1 *G. theta* и родопсинов CCR зеленых водорослей, совпадающие с консервативными участками TM-2–TM-7. Структурная гомология с канальными родопсинами иной ионной специфичности оказалась неожиданным свойством родопсинов ACR криптофитовых [7]. В свою очередь, родопсины CCR криптофитовых образуют отдельную группу, гомологичную бактериальным родопсинам насосного типа [18]. Таким образом, семейство канальных родопсинов отличается большим разнообразием и предоставляет различные примеры структурной и функциональной конвергенции.

Для поиска ACR-транскриптов в базах данных транскриптома *Rhodomonas* sp. CCMP768 (MMETSP1091 и MMETSP1389) мы использовали короткие мишени, соответствующие консервативным трансмембранным спиральям ACR1 *G. theta*: TM-3 (WARMASWLCTCPIMLGLVSN); TM-2 (WEAIYLPPTTEMITYSLAF) и TM-7 (NTSSVLYLLGDALCKNTYGILLWATTWGLL). При поиске генов CCR мы ограничились использованием одной мишени, наиболее консервативной среди известных генов CCR *G. theta* трансмембранной спирали TM-3 (RYADYMLTCLPLVMDL). Среди выявленных транскриптов отбирались содержащие все анализируемые мишени и наиболее полноразмерные (табл. 4). Как видно из результатов, представленных в табл. 4, нам удалось идентифицировать нативные транскрипты для ранее охарактеризованных генов канальных родопсинов ACR и CCR референтного штамма *Rhodomonas* sp. CCMP768. Сравнение наших результатов со сводными данными по анализу генов CCR и ACR из *Rhodomonas* sp. CCMP768 [11] подтверждает, что идентификация родопсиновых генов проведена в полном объеме. Более того, был идентифицирован ген *RhACR_9525*, ранее не охарактеризованный в *Rhodomonas* sp. CCMP768.

На основании анализа группы ACR-транскриптов были определены консервативные последовательности и созданы наборы праймеров для ПЦР-анализа (табл. 2). Расположение рабочих праймеров относительно консервативных доменов белка ACR продемонстрировано также на рис. 1.

Для наибольшей представленности генов ACR при анализе мы использовали ген-

специфические ПЦР-праймеры в сочетании с вырожденными, в том числе и для одних и тех же участков генов (например, праймеры RhACR12R, RhACR13R и RhACR14R; рис. 1). Из-за кодон-оптимизации генов ACR, представленных в базе данных GenBank, идентификацию ПЦР-продуктов проводили в режиме BLASTx для поиска охарактеризованных белков ACR. Путем перебора праймеров на геномной ДНК черноморского изолята *Rhodomonas* sp. был получен ACR-специфический ПЦР-фрагмент, *CryACR* (праймеры RhACR11_fwd + RhACR12_rev или RhACR11_fwd + RhACR14_rev), кодирующий продукт, гомологичный R1ACR_447 из *Rhodomonas* sp. CCMP768 (95% идентичности; табл. 4).

При анализе тотальной ДНК из природного беломорского образца, содержащего *Rhodomonas* sp., для выявления генов ACR одного раунда ПЦР оказалось недостаточно: ACR-специфический ПЦР-продукт (праймеры RhACR11_fwd + RhACR13_rev) был получен только после предварительной амплификации геномной ДНК с праймерами RhACR4_fwd + RhACR6_rev (рис. 1). Фрагмент гена *RhoACR* кодирует продукт, отдаленно гомологичный R2ACR_853 из *Rhodomonas* sp. CCAC1630 (56% идентичности; табл. 4). При этом оба идентифицированных гена, *CryACR* и *RhoACR* (GenBank: ON643079, ON643080; табл. 4), в разной степени гомологичны нативному транскрипту RhACR_1591 из *Rhodomonas* sp. CCMP768 (табл. 4), что также указывает на отдаленное родство *RhoACR* с известными генами ACR и на его возможную функциональную уникальность.

Для анализа генов CCR были использованы вырожденные праймеры RhCCR (табл. 2), а также ген-специфические праймеры для RhCCR_1959, наименее гомологичного в группе CCR-транскриптов из *Rhodomonas* sp. CCMP768 (данные не приводятся). Гомологи *RhCCR_1959* не были обнаружены; также безрезультатными пока остаются поиски генов CCR в беломорском изоляте *Rhodomonas* sp. Однако с помощью праймеров RhCCR в черноморском штамме *Rhodomonas* sp. удалось идентифицировать специфический ПЦР-фрагмент, *CryCCR* (GenBank: ON643078; табл. 4), кодирующий продукт, гомологичный ранее охарактеризованному катионному канальному родопсину из *G. theta*, GtCCR2 (58% идентичности; табл. 4). Существенно большую гомологию (84% идентичности) фрагмент гена *CryCCR* демонстрирует с нативным транскриптом RhCCR_4213 из *Rhodomonas* sp. CCMP768 (табл. 4).

На рис. 4 показана гомология транслированных аминокислотных последовательностей

<i>a</i>		TM-2	TM-3						
GtACR1		PWEAIYLPPTTEMITYSLAF	TGNGYIRVANGKYLPAWARMASWLCTCPIMLGLVSNMALVKY	117					
RhoACR		-----	-----	0					
RhACR_1591		TWEAVYLP LIETILYAMASTGNGQLRLGDGRVLP IARYCSWLITCPIMLFQVVGLYDLKL		120					
CryACR		-----	-----MLFQVVGLHDKL	13					
		TM-4	TM-5						
GtACR1		KSIPLNPMMAAASSICTVFGITASVLDPL	HVWLYCFISSIFFIFEMVVAFAIFAIT	IHD 177					
RhoACR		-----	-----MLYALACICEAFEFYVVFITFSEGLKM	27					
RhACR_1591		WGISCKHMVMAAALIRTVFGIGASVTLDDQMRWVQF	FLSYAFFFFELYCAYMIFGAALKQ	180					
CryACR		WGISCKHMVMAAALIRTVFGIGASVTLDDQMRWVQF	CLSYFFFFELYCAYMIFGAALKK	73					
			: : : * : * : *						
		TM-6							
GtACR1		FQTIGSPMSLKVVERLKL MRIVFYVSWMAYPILWS	FSSTGACIMSENTSSVLYLLGDALC	237					
RhoACR		FSAHRTPKKSIVLNRLMVLRALFFISWXSFP I IWLLSPTGLCLINENGSV	-----	77					
RhACR_1591		FGEVRTTLNSIVYSRILLRIFFFLSWNSFGI IWLLSSTGLCMISEDVSLAYLAADMLC		240					
CryACR		FGEVRTTLNSIVYSRIMLLRIFFFLSWNSFGI IWLLSSTGLCMISEDVSV	-----	123					
		* : . * . * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *							
<i>b</i>			TM-3						
GtCCR2		NLWCALAYFAKVLQSHSNDNGFAPLTV	IPYVDYCTTCLLLTDLWLCLDAPYKISSAVLV	115					
CryCCR		-----	-----AAHSCDDGFAPFTTIKYLDYLTTCPLLTLDMLWQLEAPYKSSCASLV	47					
RhCCR_4213		NLFCAVAYFAKLVAHSCDDGFAPFTTIKYVDYMTTCPLLTLDMLWQLEAPYKSSCASLV		120					
		: * * . * * * : * * * : *							
		TM-4	TM-5						
GtCCR2		FTCLVIAVACSLAV	APFSYCW	FAMGMVLF	FTFYVFI	SIVRQR	LDFFTL	CARDSNAKQSL	175
CryCCR		LVCLTFAIAADAAPAPANYVWFGVLSFFFTFSYTMILSIVRGR	LDF	FASCARDSNAK	SI			107	
RhCCR_4213		LVCLTFAVAVDSAPEPVNYIWFGTGLAFFFTFSYTMILSIVRGR	LDF	FASCARDSNAK	SI			180	
		: * . * : * . * * * : * : * * * : *							
		TM-6	TM-7						
GtCCR2		KHLKTAVFIYFGI WLLFP	LWLLSYRAANVISNDINHFHCILDVIAKSVYGFALL	YFKM 235					
CryCCR		GYLKVALFSYFGI WIFFPVLWILGDKGAKIVSADVSHVHFHCILDVIAKS	-----	156					
RhCCR_4213		GYLKVALFSYFGI WIFFPVLWILGDKGAKIVSADVSHVHFHCILDVIAKSCYGYALLYFKV		240					
		: * . * : * * * * : * * * : * : * * * : *							

Рис. 4. Гомология транслированных аминокислотных последовательностей фрагментов генов *CryACR*, *RhoACR*, *CryCCR* и канальных родопсинов *G. theta* и *Rhodomonas* sp. *a* – Анионные канальные родопсины; референтные родопсины GtACR1 (*G. theta*) и RhACR_1591 (*Rhodomonas* sp.). *b* – Катионные канальные родопсины; референтные родопсины GtCCR2 (*G. theta*) и RhCCR_4213 (*Rhodomonas* sp.). Желтым цветом выделены трансмембранные спирали TM-2–TM-7

фрагментов генов *CryACR*, *RhoACR*, *CryCCR* и канальных родопсинов *G. theta* и *Rhodomonas* sp.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

С развитием оптогенетики как перспективного направления медицины постоянно нарастает необходимость в расширении спектра функциональных характеристик генов родопсинов, доступных для исследователей. В настоящее время поиск новых родопсинов ведется почти исключительно биоинформатическими методами на основании данных полного секвенирования геномов и транскриптомов. Поскольку круг объектов с известным геномом или транскриптомом остается достаточно ограниченным, становится очевидным, что необходимо использовать дополнительные методы анализа для удовлетворения запроса на биоразнообразие организмов – ресурсов родопсиновых генов.

Мы разработали ПЦР-тесты для наиболее востребованных в оптогенетике генов – катионных канальных родопсинов зеленых водорослей и анионных канальных родопсинов криптофитовых водорослей. ПЦР-тест на гены CCR был опробован на ряде биотехнологически перспективных изолятов из коллекции зеленых водорослей NAMSU кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ: каротиногенных микроводорослей родов *Haematococcus* [12] и *Bracteacoccus* [23]. В результате ПЦР-скрининга мы идентифицировали и частично охарактеризовали гены CCR в штаммах *H. lacustris* и впервые показали наличие гена CCR в *Bracteacoccus*, что может указывать на эффективность ПЦР-теста в пределах таксономической группы.

Более того, единственным ПЦР-тестом обнаруживаются 2 негомологичных гена CCR в *H. lacustris* (NAMSU-ВМ-7/15), причем идентифицированные гены *98CCR1* и *98CCR1-1* соответствуют двум генам *H. lacustris* с под-

твержденной экспрессией (GenBank: JN596950, MH845643). Всего же в *H. lacustris* на основании анализа полного генома (GenBank: BLLF01000480) предсказаны 4 гена ССР, что свидетельствует о чувствительности нашего ПЦР-анализа не менее 50% в масштабах объекта. Несмотря на эффективность ПЦР-теста для поиска генов родопсинов, более детальное исследование генов, основанное на ПЦР-анализе геномной ДНК, представляется проблематичным из-за сложной организации родопсиновых генов у Chlorophyta: так, например, в составе предсказанных полноразмерных генов ССР из *H. lacustris* идентифицированы 12 и 15 экзонов (GenBank: GFH12230; GFH23030). Более перспективным, по нашим предварительным данным, является анализ 5'-фрагментов транскриптов ССР, соответствующих функциональному продукту ТМ-1–ТМ-7. Вся необходимая исходная информация для такого анализа – ПЦР-праймеры для фрагмента ТМ-2–ТМ-7 и соответствующие геномные последовательности – уже имеется в результате ПЦР-тестов.

Для поиска генов родопсинов в криптофитовых водорослях *Rhodomonas* sp. универсальными ПЦР-тестами ограничиться не удалось из-за разнообразия этих генов внутри рода *Rhodomonas*: от 2 до 8 генов каждого типа, АСР и ССР, у *Rhodomonas lens* и *Rhodomonas* sp. ССМР768 соответственно ([11] и табл. 4). Исходя из этого, мы разработали наборы ПЦР-праймеров для отдельных подгрупп родопсиновых генов (табл. 2). Примечательно, что с помощью практически идентичного ПЦР-теста мы обнаружили отдаленно гомологичные гены АСР, *CryACR* и *RhoACR*, в черноморском и беломорском образцах *Rhodomonas* sp. Особый интерес, на наш взгляд, представляет ген, кодирующий *RhoACR*: можно предположить, что в силу арктического происхождения организма родопсин *RhoACR* может обладать уникальными свойствами.

Полагаем, что разработанный нами тест может быть полезным инструментом для поиска уникальных генов анионных канальных родопсинов среди представителей *Rhodomonas* в широком диапазоне внутригрупповой гомологии.

При ПЦР-анализе на большую группу генов ССР мы идентифицировали специфический фрагмент, *CryССР*, в черноморском изоляте *Rhodomonas* sp. (табл. 4), однако соответствующего ПЦР-продукта при анализе беломорского образца *Rhodomonas* sp. обнаружить не удалось. Очевидно, с учетом низкого родства исследованных изолятов *Rhodomonas* sp. и сложного геномного состава беломорского образца

(по существу, природного сообщества) потребуются дополнительные усилия для доработки ПЦР-тестирования низкоомологичных генов ССР в *Rhodomonas* sp.

Необходимо подчеркнуть, что предлагаемые системы ПЦР-анализа предназначены для первичного тестирования объектов на наличие и уникальность генов канальных родопсинов. Дальнейшая схема эксперимента выстраивается в зависимости от потенциальной ценности гена-кандидата, а также от типа и доступности образца-источника генетического материала. При отсутствии данных по референтным геномам *Rhodomonas*, представляется логичным продолжение анализа родопсиновых генов на экспрессионном уровне. При исследовании культивируемых изолятов *Rhodomonas* sp. возможен целевой анализ 5'-фрагментов транскриптов родопсинов, соответствующих функциональному продукту ТМ-1–ТМ-7, как уже обсуждалось применительно к родопсином из зеленых водорослей. В наиболее типичном случае, когда необходимо исследовать уникальные природные образцы, включающие представителей рода *Rhodomonas*, лучшие возможности предоставляет анализ библиотек, построенных с использованием препаратов полиА-РНК.

Вклад авторов. Е.С. Лобакова, О.В. Карпова – концепция и руководство работой; Е.Н. Виноградова, О.В. Карпова – проведение экспериментов; Е.С. Лобакова, О.В. Карпова, Е.Н. Виноградова – обсуждение результатов исследования; О.В. Карпова – написание текста; Е.С. Лобакова, Е.Н. Виноградова – 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.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Ханайченко А.Н. (ФИЦ ИнБЮМ РАН, Севастополь) и Федоренко Т.А. (МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва) за предоставление культур и рекомендации по выращиванию. Исследование выполнено при поддержке научно-образовательной школы МГУ «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

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, doi: 10.3389/fncel.2021.800313.
2. 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, doi: 10.1073/pnas.122243399.
3. Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A. M., et al. (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae, *Science*, **296**, 2395-2398, doi: 10.1126/science.1072068.
4. Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., et al. (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 13940-13945, doi: 10.1073/pnas.1936192100.
5. Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., and Deisseroth, K. (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity, *Nat. Neurosci.*, **8**, 1263-1268, doi: 10.1038/nn1525.
6. Deisseroth, K. (2015) Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience, *Nat. Neurosci.*, **18**, 1213-1225, doi: 10.1038/nn.4091.
7. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Liu, X., Janz, R., and Spudich, J. L. (2015) Natural light-gated anion channels: a family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics, *Science*, **349**, 647-650, doi: 10.1126/science.aaa7484.
8. Nakao, S., Kojima, K., and Sudo, Y. (2021) Microbial rhodopsins as multi-functional photoreactive membrane proteins for optogenetics, *Biol. Pharm. Bull.*, **44**, 1357-1363, doi: 10.1248/bpb.b21-00544.
9. Klapoetke, N. C., Murata, Y., Kim, S. S., Pulver, S. R., Birdsey-Benson, A., et al. (2014) Independent optical excitation of distinct neural populations, *Nat. Methods*, **11**, 338-346, doi: 10.1038/nmeth.2836.
10. Sahel, J. A., Boulanger-Scemama, E., Pagot, C., Arleo, A., Galluppi, F., et al. (2021) Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy, *Nat. Med.*, **27**, 1223-1229, doi: 10.1038/s41591-021-01351-4.
11. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Li, H., Wang, Y., Brown, L. S., et al. (2021) Cation and anion channelrhodopsins: sequence motifs and taxonomic distribution, *mBio*, **12**, e0165621, doi: 10.1128/mBio.01656-21.
12. Chekanov, K., Lobakova, E., Selyakh, I., Semenova, L., Sidorov, R., et al. (2014) Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the white sea coastal rocks (Russia), *Mar. Drugs*, **12**, 4504-4520, doi: 10.3390/md12084504.
13. Chekanov, K., Fedorenko, T., Kublanovskaya, A., Litvinov, D., and Lobakova, E. (2020) Diversity of carotenogenic microalgae in the White Sea polar region, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **96**, fiz183, doi: 10.1093/femsec/fiz183.
14. Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., and Cohen-Bazire, G. (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales), *Bacteriol. Rev.*, **35**, 171-205, doi: 10.1128/br.35.2.171-205.1971.
15. Walne, P. R. (1970) Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria*, and *Mytilus*, *Fish. Invest.*, **26**, 162.
16. Keeling, P. J., Burki, F., Wilcox, H. M., Allam, B., Allen, E. E., et al. (2014) The Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (MMETSP): illuminating the functional diversity of eukaryotic life in the oceans through transcriptome sequencing, *PLoS Biol.*, **12**, e1001889, doi: 10.1371/journal.pbio.1001889.
17. Jékely, G. (2009) Evolution of phototaxis, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **364**, 2795-2808, doi: 10.1098/rstb.2009.0072.
18. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., and Spudich, J. L. (2016) Structurally distinct cation channelrhodopsins from Cryptophyte algae, *Biophys. J.*, **110**, 2302-2304, doi: 10.1016/j.bpj.2016.05.001.
19. Wang, Y., Tian, R. M., Gao, Z. M., Bougouffa, S., and Qian, P.-Y. (2014) Optimal eukaryotic 18S and universal 16S/18S ribosomal RNA primers and their application in a study of symbiosis, *PLoS One*, **9**, e90053, doi: 10.1371/journal.pone.0090053.
20. Krasnova, E. D., Pantyulin, A. N., Matorin, D. N., Todorenko, D. A., Belevich, T. A., et al. (2014) Cryptomonad alga *Rhodomonas* sp. (Cryptophyta, Pyrenomonadaceae) bloom in the redox zone of the basins separating from the White Sea, *Microbiology*, **83**, 270-277, doi: 10.1134/S0026261714030102.
21. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Rodarte, E. M., Janz, R., Morelle, O., et al. (2017) The expanding family of natural anion channelrhodopsins reveals large variations in kinetics, conductance, and spectral sensitivity, *Sci. Rep.*, **7**, 43358, doi: 10.1038/srep43358.
22. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Hemmati, R., Janz, R., Morelle, O., et al. (2018) Extending the time domain of neuronal silencing with cryptophyte anion channelrhodopsins, *eNeuro*, **5**, ENEURO.0174-18.2018, doi: 10.1523/ENEURO.0174-18.2018.
23. Chekanov, K., Litvinov, D., Fedorenko, T., Chivkunova, O., and Lobakova, E. (2021) Combined production of astaxanthin and β -carotene in a new strain of the microalga *Bracteacoccus aggregatus* BM5/15 (IPPAS C-2045) cultivated in photobioreactor, *Biologiya*, **10**, 643, doi: 10.3390/biologiya10070643.

IDENTIFICATION OF THE CHANNEL RHODOPSIN GENES IN THE GREEN AND CRYPTOPHYTE ALGAE FROM THE WHITE AND BLACK SEAS

O. V. Karpova^{1*}, E. N. Vinogradova^{1,2}, and E. S. Lobakova¹

¹ Department of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; e-mail: karpova_ov@mail.bio.msu.ru

² Kurchatov Institute National Research Center, 123182 Moscow, Russia

Due to the unique capability of modulating cell membrane potential upon photoactivation, the channel rhodopsins of green (Chlorophyta) and cryptophyte (Cryptophyta) algae are widely employed in optogenetics, a modern method of light-dependent regulation of the biological processes. In order for search of new perspective genes, the optogenetics candidates, we have developed the PCR tests for the rhodopsins of cation and anion channels. We have analysed 6 isolates of green algae *Haematococcus* and *Bracteacoccus* from the White Sea region and 2 specimens of *Rhodomonas* sp. (Cryptophyta) from the regions of White and Black Seas. Using our PCR test we have demonstrated the known *Haematococcus* rhodopsin genes and have discovered the novel rhodopsin genes in the genus of *Bracteacoccus*. We have also identified 2 distantly homologous anion channel rhodopsins in the cryptophytes *Rhodomonas* sp. from White and Black Seas. These results indicate that the developed PCR tests might be useful tools for a wide-range screening of the Chlorophyta and Cryptophyta algae to identify the unique channel rhodopsin genes.

Keywords: cation channel rhodopsins, anion channel rhodopsins, green algae, cryptophyte algae, optogenetics