

КАНАЛЬНЫЕ РОДОПСИНЫ: ОТ ФОТОТАКСИСА К ОПТОГЕНЕТИКЕ

Обзор

© 2023 Е.Г. Говорунова, О.А. Синешев*

электронная почта: egovoru@yahoo.com; oleg_sinesh@yahoo.com

Поступила в редакцию 24.06.2023

После доработки 09.07.2023

Принята к публикации 09.07.2023

Среди всего многообразия ретинальных белков каналные родопсины выделяются своей уникальной способностью к генерации пассивных ионных токов при фотовозбуждении. Благодаря этой способности каналные родопсины широко используются в нейрофизиологии и кардиологии как инструменты для оптогенетической манипуляции активностью возбудимых клеток. Впервые токи, генерируемые каналными родопсинами, были обнаружены в нативных клетках зеленых водорослей в 1970-е гг. В этом обзоре мы прослеживаем историю этого открытия и обсуждаем современное состояние исследований в этой области.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: родопсины, ионные каналы, фоторецепция, мембранный потенциал, жгутиковые водоросли, нейроны.

DOI: 10.31857/S0320972523100111, **EDN:** ОТОРОФ

ВВЕДЕНИЕ

Бактериородопсин, у истоков изучения которого стоял Л.А. Драчев [1–3], был первым ретинальным белком, обнаруженным не в тканях животных, а у микроорганизмов. Открытие бактериородопсина Oesterhelt и Stoeckenius [4] в начале 1970-х гг. стало сенсацией, а легкость выделения этого белка в больших количествах из организма-хозяина, галоархеи *Halobacterium salinarum*, и исключительная стабильность сделали его излюбленным объектом интенсивных биофизических, биохимических и структурно-биологических исследований [5–8]. Без преувеличения можно сказать, что сегодня мы знаем о бактериородопсине не только больше, чем о любом другом ретинальном белке, но и больше, чем о любом интегральном мембранном белке, моделью изучения которых он служит. В отличие от зрительных родопсинов, выполняющих сенсорную функцию посредством активирования энзиматического каскада, бактериородопсин — электрогенная протонная помпа, осуществляющая трансмембранный пе-

ренос протона из цитоплазмы во внеклеточную среду и обеспечивающая основной механизм утилизации солнечной энергии в клетках галоархей.

Обнаружение фотоэлектрической активности бактериородопсина стимулировало поиски подобных процессов у других микроорганизмов. Большинство подвижных про- и эукариот способны реагировать на свет изменением характера своего движения [9, 10]. Первые сенсорные родопсины, SRI [11–13] и SRII [14], были открыты у *Hal. salinarum*. При фотовозбуждении эти белки не генерируют трансмембранные электрические токи, а запускают энзиматический каскад, в конце концов приводящий к двигательным реакциям клеток. В отличие от галоархей, реагирующих на свет изменением частоты реверсий направления движения, одноклеточные зеленые водоросли способны к настоящему фототаксису, т.е. к ориентированному движению по направлению светового луча [15]. Обсуждение этого явления с Е.Н. Кондратьевой, известным специалистом по фототрофным микроорганизмам [16], а также успешная регистрация фотоиндуцированных изменений потенциала изолированных хлоропластов высших растений [17] способствовали началу работ по изучению возможной роли электрических процессов в фото-

Принятые сокращения: КР — каналный родопсин; ПФТ — поздний фоторецепторный ток; РФТ — ранний фоторецепторный ток.

* Адресат для корреспонденции.

рецепции зеленых водорослей на кафедре физико-химической биологии биологического факультета МГУ под руководством Ф.Ф. Литвина. Электрические стадии трансдукции фотосенсорного сигнала не удалось обнаружить, вводя микроэлектрод в клетку водоросли, как это делается для регистрации электрических явлений, связанных с фотосинтезом [18]. Только разработка нового метода внеклеточного отведения при помощи электрода-присоски вторым автором настоящего обзора позволила этого достичь [19, 20].

При помощи этого метода было показано, что освещение в спектральной области, характерной для фототаксиса, приводит к генерации трансмембранного фоторецепторного потенциала в области мембраны, прилегающей к «глазку» (стигме) — внутриклеточному органеллу, представляющему собой скопление каротиноидных гранул и служащему для модуляции освещенности фоторецептора во время движения клетки. Изотоническое распространение деполяризующего фоторецепторного потенциала на мембрану жгутиков вызывает регенеративную электрическую реакцию, подобную потенциалу действия нейронов. Успех этих работ был в значительной мере связан с удачным выбором объекта — *Haematococcus pluvialis*, зеленой водоросли относительно большого размера с эластичной клеточной стенкой. Разработка вторым автором этого обзора другого оригинального метода — измерения фототоков в суспензии свободно плавающих микроорганизмов — позволяет регистрировать обе стадии этого фотоэлектрического сенсорного каскада практически в любом организме, обладающем фототаксисом, независимо от его размера [21]. При помощи суспензиального метода удалось измерить фототоки у всех исследованных зеленых и криптофитовых водорослей [22–27].

В отличие от бактериородопсина, основного компонента пурпурных мембран, занимающих ~50% поверхности клетки, фоторецепторные белки, ответственные за фототаксис жгутиковых водорослей, присутствуют в их клетках в очень низкой концентрации [28] и не поддаются очистке биохимическими методами. На основании анализа спектров действия фототаксиса Foster и Smyth [29] было высказано предположение, что они могут быть ретиальными белками. Обширный набор косвенных данных, полученных в 1980–1990-е гг., включая восстановление фототаксиса у «слепых» мутантов зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, не способных синтезировать каротиноиды, после добавления экзогенного

ретинала, позволил подтвердить это предположение [30–32]. Идентифицировать же фоторецепторные белки хламидомонады (а точнее, кодирующие их гены) на молекулярном уровне удалось только после того, как были разработаны дешевые методы секвенирования полинуклеотидных последовательностей, причем оказалось, что геном *C. reinhardtii* кодирует не один, а два таких белка [23, 33–35]. Примечательно, что по своей аминокислотной последовательности, изомерному составу хромофора и первичным фотохимическим процессам родопсины *C. reinhardtii* оказались ближе к бактериородопсину, чем к зрительным родопсинам животных. Исследование фоторецепторных токов генетических трансформантов хламидомонады с пониженным содержанием родопсинов позволило установить, что эти белки служат фоторецепторами при фототаксисе и фотофобной (фотошоковой) двигательной реакции этой водоросли, хотя генерируемые ими фоторецепторные токи различаются по своим свойствам [23, 28].

Но в полной мере уникальность родопсинов хламидомонады выявилась путем экспрессии их генов в клетках животных, таких как ооциты шпорцевой лягушки, выполненной Nagel et al. [33, 34] (ранее эта методика была успешно применена и к бактериородопсину [36]). Оказалось, что, в отличие от этого последнего, родопсины хламидомонады осуществляют пассивный транспорт катионов (не только протонов, но и ионов натрия, калия и, в значительно меньшей степени, кальция) через клеточную мембрану, т.е. представляют собой фотоактивируемые катионные каналы, единственные в своем роде. Эта особенность послужила основанием для введения специального термина для обозначения этих белков, «канальные родопсины» (channelrhodopsins, КР), быстро вытеснившего их прежние наименования «сенсорные родопсины хламидомонады» [23] и «родопсины архейного типа» [35].

Широкую известность КР приобрели после того, как было показано, что с их помощью можно стимулировать активность нейронов освещением [37–39]. Эта методика, получившая название «оптогенетики», произвела настоящую революцию в нейрофизиологии и смежных областях [40–43]. Более того, есть основания надеяться, что КР могут оказаться полезными для генной терапии многих нервных, психиатрических и сердечно-сосудистых заболеваний [44, 45]. Особый оптимизм вызывает возможность оптогенетического восстановления зрения у пациентов с дегенерацией

сетчатки [46]. Протонные помпы, подобные бактериородопсину, тоже находят применение в оптогенетике в качестве инструментов для подавления активности нейронов [47], хотя они переносят против электрохимического градиента менее одного заряда на каждый поглощенный фотон и потому генерируют не такие большие токи, как КР, что требует более интенсивного и/или длительного освещения для изменения мембранного потенциала.

Массовое секвенирование геномов и транскриптомов привело к открытию КР у эукариот из нескольких других базовых таксонов, помимо зеленых водорослей. Более того, выяснилось, что кроме катионных КР, у фототрофных [48] и даже гетеротрофных [49] протистов широко распространены КР, селективно проводящие анионы. Катионная же проводимость, по всей вероятности, независимо возникла по крайней мере дважды в эволюции КР, причем в одном случае эти белки сохранили многие черты, роднящие их с бактериородопсином [50]. Наконец, в прошлом году были обнаружены катионные КР, проводящие ионы калия много лучше, чем ионы натрия [51], и можно предполагать, что этим разнообразие КР еще не исчерпывается.

У ретинальных ионных помп, подобных бактериородопсину, все этапы ионного транспорта строго привязаны к определенным стадиям цикла фотохимических превращений пигмента (фотоцикла), регистрируемого оптическими методами на очищенных белках или мембранах [52]. В отличие от помп, фототоки КР различных семейств коррелируют с разными стадиями фотоцикла, предоставляя информацию о механизмах функционирования каналов [50, 53–55].

В этом обзоре мы рассмотрим методы регистрации канальной активности родопсинов в нативных клетках, фотоэлектрический каскад жгутиковых водорослей, фоторецепторную роль КР в фототаксисе, а также затронем их разнообразие и оптогенетическое применение. Более детальные сведения о молекулярных механизмах КР могут быть почерпнуты из других обзоров [56–59]. Истории и принципам оптогенетики также посвящено много публикаций [42, 60–65].

МЕТОДЫ РЕГИСТРАЦИИ КАНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ РОДОПСИНОВ В КЛЕТКАХ ЖГУТИКОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

Внутриклеточные микроэлектроды широко применяются для регистрации фотоиндуциро-

ванных изменений мембранного потенциала палочек и колбочек сетчатки, опосредованных закрытием каналов, регулируемых циклическими нуклеотидами [66]. Малый объем клеток жгутиковых водорослей, однако, затрудняет использование этого метода для изучения канальной активности их родопсинов. Некоторые зеленые жгутиконосцы, в первую очередь *H. pluvialis*, обладают эластичной клеточной стенкой, позволяющей всасывать их клетки в микроприсоску. При этом не образуется гигантского контакта мембраны клетки со стеклом присоски, необходимого для фиксации мембранного потенциала (технология пэтч-кламп), но асимметричное распределение КР в мембране позволяет регистрировать генерируемые ими фотоиндуцированные сигналы [19, 20]. Тринадцать лет спустя этот метод (получивший название метода электрода-присоски; рис. 1, а) был применен к мутанту *C. reinhardtii*, лишенному твердых слоев клеточной оболочки [67], а еще через восемь лет – к мутанту *Volvox carterii* [68]. *C. reinhardtii* – модельный объект многих биологических исследований, и именно в его геноме впоследствии были идентифицированы первые гены КР [23, 33–35].

Метод электрода-присоски позволил впервые обнаружить, что восприятие света фоторецепторными молекулами жгутиковых водорослей приводит к деполяризации их мембраны [19, 20], что и заложило основу для развития оптогенетики четверть века спустя. Однако этот метод не только является достаточно трудоемким, но его применение еще и ограничено клетками с эластичной оболочкой, редко встречающимися среди жгутиконосцев. Кроме того, механическое всасывание клетки в присоску может стимулировать активность ее механорецепторов [69] и в любом случае представляет собой неестественную ситуацию. Асимметричная локализация молекул-генераторов фототоков в разных участках клеточной мембраны, установленная методом «электрода-присоски», привела к мысли, что суммарный ток тысяч клеток в суспензии может быть зарегистрирован и без искусственного увеличения сопротивления между различными участками мембраны стеклом присоски.

В первой модификации суспензионного метода фотовспышка направляется вдоль линии, соединяющей электроды (рис. 1, б). Фоторецепторный ток, генерируемый КР в клетках жгутиконосцев, повернутых в момент световой вспышки своими фоторецепторами в сторону источника света, превышает по амплитуде ток, генерируемый клетками, ориентированными противоположным образом,

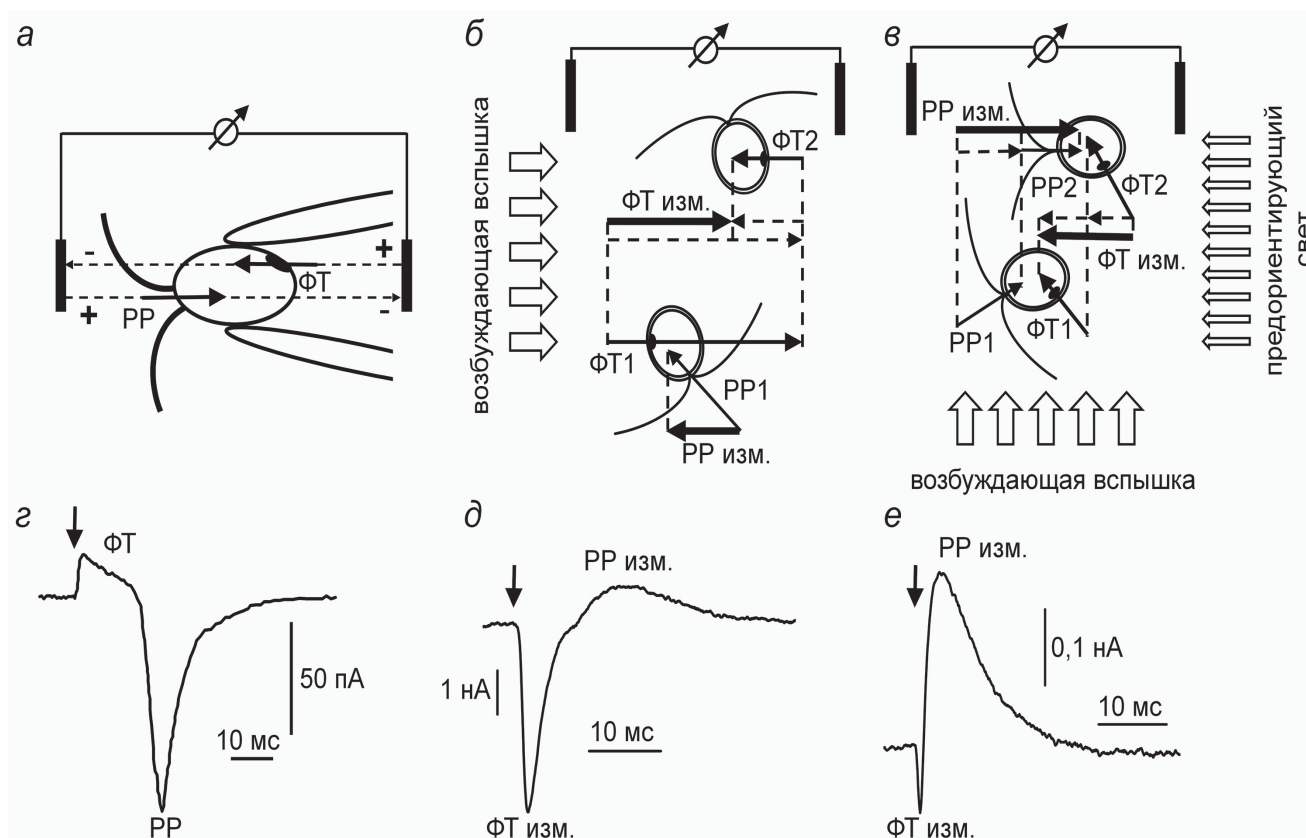


Рис. 1. Методы измерения и примеры фотоэлектрических сигналов, регистрируемых в клетках зеленых жгутиковых водорослей: а–в – схемы метода электрода-присоски (а), измерений в суспензии неориентированных клеток (б) и измерений в суспензии предориентированных клеток (в); г–е – примеры сигналов, отводимых от одиночной клетки (г), суспензии неориентированных клеток (д) и суспензии предориентированных клеток (е). Стрелками на панелях г–е показан момент возбуждающей вспышки. ФТ – фоторецепторный ток; РР – регенеративная реакция; изм. – измераемый

и разница между этими токами регистрируется погруженными в суспензию электродами. Другая модификация метода измерения фоторецепторных токов в суспензии водорослей основана на предориентации клеток светом, вызывающим фототаксис, или гравитационным полем, направленными перпендикулярно измерительной вспышке (рис. 1, в). В этом случае электроды регистрируют проекцию фоторецепторного тока на направление предориентирующего фактора, что позволяет оценить и мгновенное значение степени ориентации [21, 70, 71].

При использовании обеих модификаций суспензионного метода регистрация производится в полностью физиологических условиях и не ограничивается размерами микроорганизмов и строением их клеточной стенки. Универсальность и техническая простота позволили распространить этот метод на исследование большого числа мутантов хламидомонады с нарушениями строения стигмы [72] и дефектами фотоповедения [73, 74]. Кроме того, при помощи суспензионного метода было установлено, что появление фототаксиса

у «слепых» бескаротиноидных мутантов после добавления экзогенного ретиналя действительно связано с регенерацией самих фоторецепторных белков, а не, например, встраиванием ретиналя в стигму [31]. Более того, суспензионный метод позволил обнаружить и охарактеризовать генерируемые КР фотоиндуцированные сигналы еще у целого ряда зеленых водорослей, а именно, представителей родов *Spermatozopsis*, *Hafniomonas*, *Polytomella*, *Mesostigma* и *Platymonas*, а также у филогенетически далекой криптофитовой водоросли *Cryptomonas* [24–27]. Наконец, суспензионный метод измерения фоторецепторных токов был использован как косвенный подход для изучения гравирецепции [21] и хеморецепции [75] хламидомонады, а также послужил основой для разработки экспресс-биотеста для оценки степени загрязнения воды тяжелыми металлами и формальдегидом [76, 77]. С более детальным техническим описанием обоих методов, электрода-присоски и суспензионного, можно ознакомиться в нескольких ранее опубликованных обзорах [25, 70, 71].

Электрофизиологические исследования фоторецепторного тока предоставили сведения о фоторецепторных белках жгутиковых водорослей еще до того, как были клонированы кодирующие их гены. Производство квантового выхода на оптическое сечение поглощения молекулы, полученное путем аппроксимации световой зависимости фоторецепторного тока, имеет характерное для ретинальных белков значение $0,8 \text{ \AA}$ [78]. Восстановление фоторецепторного тока после насыщающей вспышки позволило оценить длительность фотоцикла фоторецепторного пигмента (100 мс). Исследования зависимости амплитуды фоторецепторного тока от ориентации плоскости поляризации светового стимула показало, что ретинальный хромофор расположен в плоскости мембраны клетки [79, 80]. Спектры действия фоторецепторного тока и фотоповедения *H. pluvialis* имеют сложную многополосную форму, указывающую на то, что фоторецепторная система жгутиконосцев может состоять из нескольких пигментов. Вклад двух фоторецепторных белков в фототаксис был непосредственно продемонстрирован на модельном организме *C. reinhardtii* [23], а у других водорослей обнаружено еще больше кандидатов на эту роль. Однако все эти белки представляют собой не светоактивируемые ионные помпы, как бактериородопсин, а светоактивируемые ионные каналы [33, 34].

ФОТОЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ КАСКАД ПРИ ФОТОТАКСИСЕ ЖГУТИКОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

Фотоэлектрический сигнал, отводимый от клеток *H. pluvialis*, фиксированных на микроприсоске, состоит из градуального фоторецепторного тока и вызываемой им вторичной регенеративной реакции, протекающей по принципу «все или ничего». Сравнение знаков этих компонентов сигнала при всасывании в присоску различных частей клетки позволило установить, что первичный ток, направленный внутрь клетки, протекает только через небольшой участок мембраны, подстилающий стигму [19, 20, 67]. Первоначально предполагалось, что сам этот внутриклеточный органоид содержит фоторецепторный пигмент [81], но впоследствии выяснилось, что он играет только вспомогательную роль затеняющего и/или фокусирующего свет образования [29, 82, 83].

После клонирования генов КР появилась возможность исследовать внутриклеточную локализацию кодируемых ими белков методами

иммунофлуоресцентной микроскопии. Было показано, что КР *C. reinhardtii* сосредоточены главным образом в области стигмы [35, 84, 85], что полностью соответствует результатам электрофизиологических измерений. Анализ препарата изолированных стигм методами протеомики тоже показал наличие КР [86]. Согласно текущим представлениям, молекулы КР встроены в плазматическую мембрану, обнаруживающую особую ультраструктуру в области, прилегающей к стигме [87]. У клеток *C. reinhardtii*, выращиваемых при циклическом освещении, иммунофлуоресцентными методами КР найдены, помимо стигмы, еще в жгутиках и базальных телах, причем их количество в этих органоидах зависит от фазы цикла [88, 89]. Функциональное состояние локализованных там родопсинов пока неизвестно.

Во время движения клетки жгутиконосцев вращаются вокруг своей оси, так что фоторецепторный участок плазматической мембраны испытывает периодическое изменение освещенности [9, 29, 90–94]. Для клетки, удерживаемой на микроприсоске, эти условия можно смоделировать периодическим освещением с частотой около 1 Гц. При использовании интенсивности света, вызывающей фототаксис, у клетки *H. pluvialis* наблюдается увеличение частоты биения *цис*-жгутика (ближайшего к стигме) и снижение частоты биения *транс*-жгутика на включение света, и противоположные реакции – на его выключение [78, 90, 95]. У свободно плавающей клетки такие асимметричные изменения биения жгутиков должны приводить к изменению направления ее движения, т.е. фототаксису. Более детально исследованные фотоиндуцированные двигательные реакции жгутиков *C. reinhardtii* выражаются в изменении не только частоты, но и амплитуды и скорости биения [96–99].

Регенеративная электрическая реакция протекает в мембране жгутиков и потому часто описывается в литературе как «жгутиковый ток» [32, 67, 70]. Параллельная регистрация биения жгутиков фиксированной на присоске клетки и ее фотоэлектрического ответа показала, что регенеративная реакция вызывает изменение характера биения жгута, наблюдаемого у свободно движущейся клетки во время фотофобной реакции [19, 20, 78, 95, 100]. Эта реакция представляет собой резкую остановку и/или изменение направления движения клетки, наблюдаемую, когда интенсивность или длительность светового стимула превышает некоторый порог [9, 10, 91, 101, 102].

Амплитуда регенеративной реакции практически не зависит от интенсивности свето-

вого стимула, в то время как длительность лаг-периода от начала освещения до начала этой реакции обнаруживает обратную зависимость от интенсивности света. Интервал под кривой фоторецепторного тока до начала регенеративной реакции остается постоянным при любой интенсивности и увеличивается при использовании красного фонового освещения, гиперполяризующего мембрану за счет фотосинтеза [18, 78, 79, 103]. Это показывает, что для инициации регенеративной реакции требуется перенос через мембрану определенного числа зарядов, деполяризующего ее на несколько мВ.

Выраженная зависимость регенеративной реакции от концентрации Ca^{2+} в среде и ее чувствительность к блокаторам кальциевых каналов свидетельствуют о том, что она является результатом открывания потенциал-зависимых кальциевых каналов в мембране жгутиков клетки [19, 20, 67]. Анализ изменения амплитуды регенеративной реакции в процессе отрастания жгутиков у клеток *C. reinhardtii* после их ампутации показал, что опосредующие ее каналы распределены по всей длине жгутика [104]. Наличие мутанта, не способного к генерации регенеративной реакции [74], позволило клонировать ген *cav2*, кодирующий эти каналы [105]. Иммунофлуоресцентная микроскопия выявила преимущественное сосредоточение белка CAV2 в проксимальной части жгутика.

КОМПОНЕНТЫ ФОТОРЕЦЕПТОРНОГО ТОКА

Использование наносекундных лазерных вспышек и записи с высоким временным разрешением позволило установить, что фоторецепторный ток состоит из двух компонентов, различающихся по своим свойствам [25, 32, 78, 95, 106, 107]. Эти компоненты выявляются у всех исследованных организмов, свидетельствуя об общих принципах организации их фоторецепторных систем и цепей трансдукции сигнала. Появление раннего фоторецепторного тока (РФТ) ограничено только скоростью пропускания измерительной системы (<30 мкс — для клетки на присоске [106] и <3 мкс — для суспензионного метода [31]). Напротив, поздний фоторецепторный ток (ПФТ) регистрируется с задержкой вплоть до нескольких миллисекунд, длительность которой зависит от интенсивности светового стимула. По крайней мере два компонента выявляются и в кинетике спада сигнала. Световое насыщение РФТ

определяется только фотохимическими процессами поглощения света, в то время как насыщение ПФТ наблюдается при интенсивностях примерно в 1000 раз меньше. Только ПФТ, но не РФТ, обнаруживает зависимость от температуры и красного фонового освещения, активирующего фотосинтез и приводящего к гиперполяризации мембраны [18, 106]. Наконец, ПФТ обладает более выраженной зависимостью от концентрации Ca^{2+} в среде, чем РФТ [25]. Таким образом, кинетика собственно ПФТ может быть определена как разностный сигнал до и после всех этих воздействий (рис. 2, а).

Максимальные амплитуды токов, наблюдаемые в насыщении ПФТ и РФТ соотносятся, как $<1 : 10$. Деполяризация мембраны, однако, пропорциональна не максимальному току, а числу зарядов, перенесенному через мембраны, т.е. интегралу тока. Медленное закрытие каналов ПФТ приводит к тому, что деполяризация мембраны благодаря РФТ и ПФТ оказывается практически одинаковой в насыщении, хотя это насыщение отличается в 1000 раз по интенсивности (рис. 2, б).

Кальциевые каналы, через которые протекает ПФТ, локализованы вблизи стигмы, но не обязательно в ее пределах. Именно эти вторичные Ca^{2+} -каналы обеспечивают крайне высокую, почти «single-quantum» чувствительность фототаксиса [108]. Важно подчеркнуть, что, в отличие от каналов в мембране жгутика, они не являются потенциал-зависимыми, поскольку генерируют градуальный ток (т.е. ток, амплитуда которого меняется при изменении величины стимула). В геноме *C. reinhardtii* идентифицировано по крайней мере 43 гена Ca^{2+} -каналов [109], но функции лишь немногих из кодируемых ими белков были установлены. В изолированных препаратах стигм обнаруживается несколько Ca^{2+} -связывающих белков, но не Ca^{2+} -каналы [86, 110]. Одна из возможных причин — недостаточная чувствительность методов протеомики для идентификации интегральных мембранных белков. Также вероятно, что эти гипотетические каналы не являются гомологами каких-либо прежде известных Ca^{2+} -каналов, и потому их последовательности не распознаются как таковые.

Механизмы активации вторичных каналов при генерации ПФТ пока не ясны. В препаратах изолированных стигм, содержащих и фоторецепторную мембрану, были обнаружены гетеротримерные ГТФазы, Ca^{2+} -зависимые протеин-киназы и фосфатазы [111–113]. Однако эти белки могут быть элементами других сигнальных каскадов, например, запускаемых

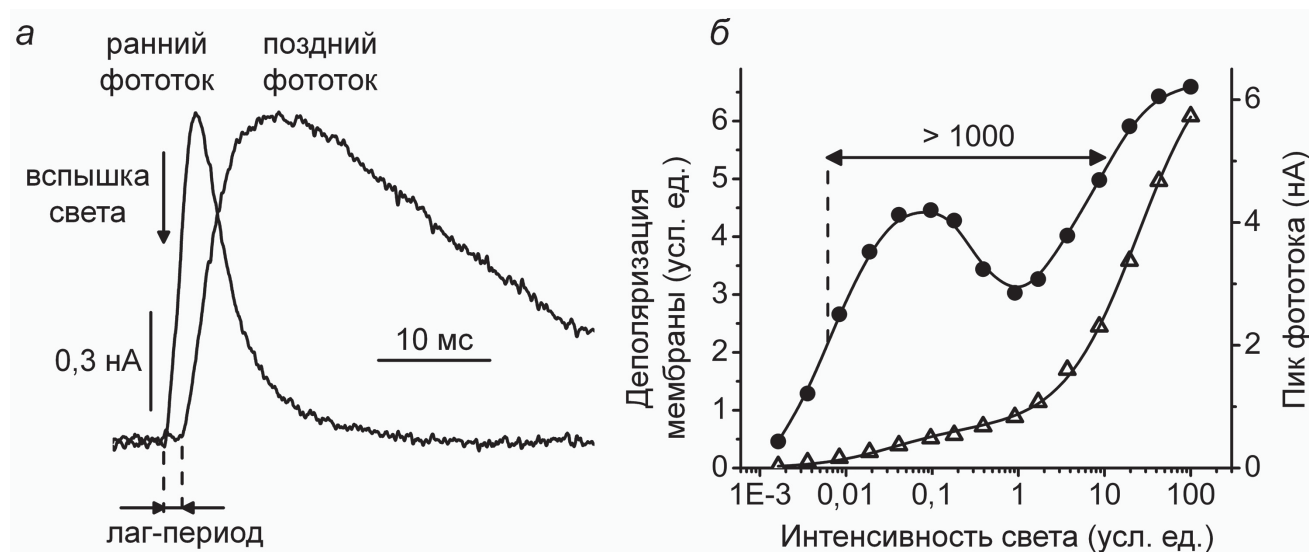


Рис. 2. Характеристики компонентов фоторецепторного тока зеленой жгутиковой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*: а — кинетика раннего и позднего фоторецепторных токов, измеренных в суспензии клеток; б — световая зависимость пиковой амплитуды фоторецепторного тока (правая ось ординат) и интеграла под кривой тока (левая ось ординат)

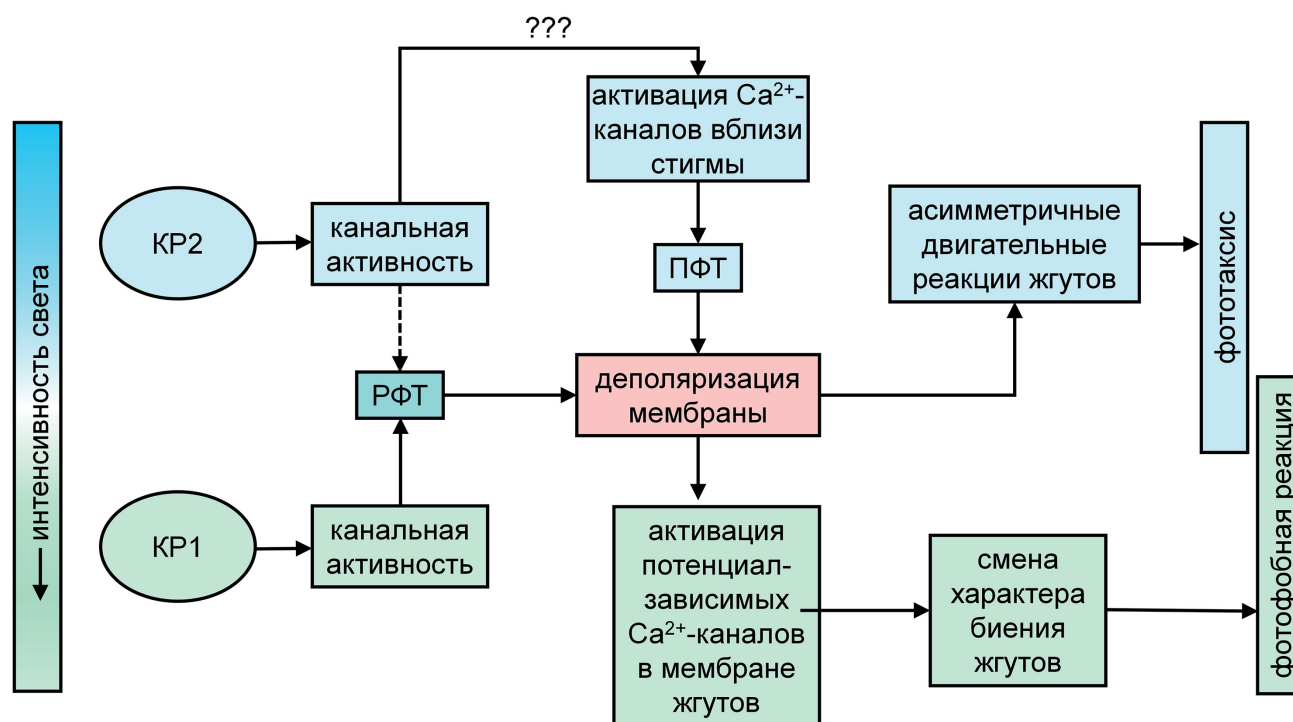
фотовозбуждением фототропина, также обнаруженного в препаратах стигм [86, 110]. Было показано, что фототропин опосредует фоторегуляцию размера стигмы и количества КР в клетке [114].

Отсутствие лаг-периода и высокие интенсивности насыщения РФТ позволили предположить, что этот ток протекает непосредственно через фоторецепторные пигменты [32, 103]. Попытки определить ионную селективность КР методом электрода-присоски у *C. reinhardtii* [115, 116] и *V. carteri* [68] не дали отчетливого результата из-за невозможности фиксации потенциала и трудности разделения РФТ и ПФТ в таких экспериментах. Ионная селективность КР этих и десятков других микроорганизмов была установлена только в пэтч-кламп-экспериментах на культивируемых клетках животных, трансформированных соответствующими генами.

Идентификация генов КР в геноме *C. reinhardtii* и развитие методов генетической трансформации этого модельного объекта позволило подтвердить роль кодируемых белков как фоторецепторов, опосредующих фототаксис и фотофобную реакцию этой водоросли. При помощи метода РНК-интерференции К. Джангом в лаборатории Дж. Спудича были получены трансформанты с пониженным содержанием каждого из двух родопсинов, первоначально названных родопсинами А и В [23, 28] и впоследствии известных как каналные родопсины 1 и 2 (КР1 и КР2). Интересно, что подавление экспрессии гена, кодирующего КР1, способствовало стимуляции экспрессии гена,

кодирующего КР2, что привело к дальнейшему увеличению соотношения КР2/КР1 у КР1-трансформанта. Ток, генерируемый КР1, по своей кинетике сходен с РФТ, а ток, генерируемый КР2 — с ПФТ. Более того, КР1-генерируемый ток обладает высоким световым насыщением, как и РФТ, а ток, генерируемый КР2, — низким световым насыщением, как и ПФТ. Кроме того, различаются и спектры действия двух токов, свидетельствующие о различии спектров поглощения двух родопсинов: спектральный максимум тока, опосредованного КР1, приходился на 510 нм, а тока, генерируемого КР2, — на 470 нм, что подтвердилось путем измерения абсорбционных спектров выделенных пигментов, полученных благодаря гетерологической экспрессии их генов [84, 117, 118].

Измерение фотоориентации клеток методом регистрации фототоков в суспензии предориентированных клеток и фотофобной реакции путем записи траекторий движения показало, что оба КР служат фоторецепторами в обоих этих фоторегуляторных процессах [23, 28]. Измерение фотоориентации методом светорассеяния у независимо полученного штамма с пониженным содержанием КР1 подтвердило фоторецепторную роль этого белка [84]. Тот факт, что задержанный ПФТ, обладающий более низким световым насыщением, генерируется преимущественно КР2, делает его основным фоторецептором при фототаксисе, в то время как КР1, преимущественно генерирующий РФТ, вносит основной вклад в фотофобную реакцию, возникающую при



более высоких интенсивностях света (рис. 3). Следует, однако, отметить, что сравнительное содержание KP1 и KP2 различается у разных штаммов дикого типа [23, 84, 119], что может сказываться и на сравнительном вкладе этих белков в фотоповедение клеток.

Метод CRISPR/Cas9 позволил не только разрушить гены КР, но и получить штаммы *C. reinhardtii*, содержащие точечные мутации каждого из них [119]. У всех исследованных мутантов наблюдалось снижение чувствительности фотоориентации, однако и содержание большинства мутантных белков в клетке было пониженным по сравнению с контролем. У мутанта КР2, обладающего пониженной проницаемостью для протонов по сравнению с ионами натрия, согласно исследованиям на модельных клетках, фоторецепторные токи удалось обнаружить только в присутствии натрия в среде, что подтвердило значение протонных токов для фототаксиса у дикого типа.

Молекулы всех известных КР состоят из, собственно, родопсинового домена, представляющего собой комплекс из семи трансмембранных α -спиралей, и почти равного ему по числу аминокислотных остатков цитоплазматического фрагмента. Как показала гетерологическая экспрессия, для осуществления канальной функции необходим и достаточен только семиспиральный родопсиновый домен. Соответственно, для оптогенетических целей

и функциональных исследований КР в модельных клетках используются почти исключительно их трансмембранные домены. Изучение же функций цитоплазматических фрагментов в клетках *C. reinhardtii* потребовало развития методов редактирования генома этого организма [121]. Было показано, что удаление последних 78 С-терминальных аминокислотных остатков КР1 приводит к смещению положения стигмы в переднюю часть клетки (тот же эффект наблюдается и после разрушения всего гена, кодирующего КР1) [122]. Более того, присоединение флуоресцентной метки к С-терминальному участку вызывает нарушение транспортировки КР1 в плазмалемму. Эти наблюдения подтверждают ранее высказанную гипотезу, что цитоплазматические фрагменты КР отвечают за их правильную локализацию в клетке.

Важная роль цитоплазматического домена в функционировании микробных родопсинов была показана ранее на примере сенсорного родопсина из сине-зеленой водоросли *Anabaena* [123]. Модификации цитоплазматического домена КР также влияют на кинетику фототоков [124]. Фосфорилирование аминокислотных остатков в проксимальном цитоплазматическом сегменте КР1 и КР2 было обнаружено при помощи масс-спектрометрического анализа препаратов *C. reinhardtii* [110]. Быстрые изменения степени фосфорилирования КР1 коррелируют со знаком фототаксиса, т.е. направлением движения клеток к источнику света или от него [125]. Очевидно, что как локализация фоторецепторов, так и изменения характеристик его фототока определяют изменения знака фототаксиса.

Биоинформационный анализ цитоплазматических фрагментов КР некоторых протистов (но не *C. reinhardtii*) выявил наличие гомологов разнообразных доменов, задействованных в энзиматических сигнальных каскадах других организмов [126, 127], однако об их функции в клетках пока ничего не известно. Кроме того, цитоплазматические фрагменты КР некоторых зеленых водорослей содержат сайты связывания белка SUMO (small ubiquitin-like modifier), а биохимические данные подтверждают обратимое связывание этого белка с КР1 в лизатах *C. reinhardtii* и регуляцию стабильности последнего [128]. Наконец, методом иммунопреципитации было показано связывание цитоплазматических фрагментов КР1 и КР2 с малой ГТФазой ARL11, принадлежащей к семейству Arf ГТФаз, которые опосредуют транспорт белков в жгутики и реснички клеток животных [128].

РАЗНООБРАЗИЕ КР И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ОПТОГЕНЕТИКЕ

Регистрация фотоиндуцированных электрических сигналов в клетках зеленых жгутиковых водорослей показала, что КР широко распространены у представителей этой систематической группы [25–27]. Зеленые водоросли — ближайшие родственники наземных растений, что послужило основанием для секвенирования геномов многих их видов, включая те, что прежде были исследованы электрофизиологическими методами [129, 130]. Биоинформатический анализ полученных данных выявил >200 индивидуальных последовательностей КР у этих микроорганизмов (списки которых опубликованы в работах Rozenberg et al. [127] и Govorunova et al. [131]), далеко не все из которых были исследованы путем гетерологической экспрессии в модельных клетках. Подавляющее большинство из исследованных таким образом микроорганизмов представляют собой, как и КР *C. reinhardtii*, преимущественно протонные каналы, также способные проводить Na^+ , K^+ и, в значительно меньшей степени, Ca^{2+} [26, 27, 33, 132, 133]. В совокупности эти белки известны в литературе как «катионные КР» [58, 131, 134]. Эти КР широко используются в оптогенетике для стимуляции активности нейронов и других возбудимых клеток при помощи света [40–42].

Все исследованные криптофитовые водоросли способны к фотоориентации [135–137], а у одного из их пресноводных представителей регистрируются фоторецепторные токи, близкие по свойствам к токам зеленых жгутиконосцев [24]. Полностью отсекутированный геном морской водоросли *Guillardia theta* кодирует несколько десятков родопсинов, среди которых есть КР [48, 138], протонные помпы [139] и белки, не обладающие транспортной функцией [24]. По крайней мере пять КР *G. theta* функционируют как катионные каналы при экспрессии в клетках млекопитающих [138, 140, 141], и многие их гомологи обнаружены у других криптофитов [142]. Примечательно, что по своей первичной последовательности и некоторым деталям транспортного механизма эти белки больше похожи на галоархейные протонные помпы, чем на КР зеленых водорослей, и потому получили название «бактериородопсин-подобные КР» [50]. Это сходство подтвердилось еще и тем, что эти белки представляют собой тримеры [143, 144], а не димеры, как КР зеленых водорослей [145–147]. Большинство бактериородопсин-подобных КР генерируют маленькие токи при экспрессии

их генов в клетках животных, но по крайней мере один их представитель, известный как ChRmine, пользуется популярностью в качестве оптогенетического инструмента для стимуляции нейронов зеленым светом [148, 149].

Другая группа КР *G. theta* обладает исключительно анионной селективностью [48]. Гомологичные им белки были обнаружены у многих других видов криптофитовых водорослей и получили название «анионные КР» [150, 151]. Благодаря низкой концентрации Cl^- в соме зрелых нейронов открывание этих КР приводит к вхождению Cl^- внутрь клетки, гиперполяризации мембраны и подавлению генерации потенциалов действия. Анионные КР были успешно использованы в качестве оптогенетических ингибиторов нейронной активности и поведения червей, насекомых, рыб и млекопитающих [48, 152–158]. Кроме того, они нашли применение как инструмент для оптогенетического контроля движения устьичных клеток и направления роста высших растений [159, 160].

Помимо криптофитов, анионные КР были обнаружены у гаптофитовых водорослей [49] и даже у некоторых представителей морских зеленых водорослей [127]. Более того, гомологичные белки (точнее, кодирующие их гены) были выявлены у гетеротрофных организмов, принадлежащих к надотделу страменопиллов [49, 131, 161]. Примечательно, что большинство этих организмов, если не все, обладают жгутиками по крайней мере на одной из стадий своего жизненного цикла. Представляется вероятным, что в своих нативных клетках анионные КР, так же как и катионные, служат фоторецепторами при фототаксисе, хотя эта гипотеза требует экспериментальной проверки.

Применение анионных КР, ~200 последовательностей которых известны в настоящий момент [127, 131] как оптогенетические ингибиторы, ограничено направлением их токов в клетках-реципиентах. В терминалах многих аксонов концентрация Cl^- выше, чем в соме, в результате чего фотовозбуждение анионных КР деполяризует мембрану и даже может приводить к генерации потенциалов действия [162–165]. В какой-то мере эти побочные эффекты удастся преодолеть путем добавления к кодирующей последовательности так называемых «направляющих сигналов», предотвращающих транспорт КР в аксоны [163, 165, 166], но полностью исключить возможность нежелательной деполяризации таким образом не удастся.

Вот почему обнаружение в прошлом году КР, обладающих большей проницаемостью

для K^+ , чем для Na^+ , привлекло внимание пользователей. Первые два белка такого рода, названные «калийными КР», были найдены у гетеротрофного страменопила *Hyphochytrium catenoides* [51], а впоследствии их гомологи были обнаружены и у некоторых других организмов [167, 168]. Результаты первых опытов по подавлению нейронной активности при помощи калийных КР выглядят очень обнадеживающе [51, 167, 169], так что можно надеяться, что в будущем именно они станут основным инструментом для этой цели.

Необходимо отметить, что в настоящее время в оптогенетике, основанной на КР, используется только одна функция этих пигментов — прямой ток через молекулу. Вторая и важнейшая в нативных клетках функция — генерация задержанного фоторецепторного кальциевого тока с усилением в 1000 раз — пока не нашла практического применения, потому что осуществляющие ее кальциевые каналы пока не удалось идентифицировать на молекулярном уровне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В 1970-е гг., когда в МГУ начались исследования фотоэлектрической активности бактериородопсина и еще не идентифицированных на молекулярном уровне КР, было, конечно, невозможно предвидеть появление целой новой области биомедицины, известной сегодня как оптогенетика и основанной на использовании этих белков для манипуляции мембранным потенциалом при помощи света. В настоящее время лишь одна из функций рецепторов фототаксиса (их канальная активность) применяется в оптогенетике. Сложный и исключительно чувствительный каскад трансдукции светового стимула при фототаксисе еще ждет своего применения. Тем не менее этот пример служит наглядной иллюстрацией важности фундаментальных исследований для научно-технического прогресса.

Вклад авторов. Е.Г. Говорунова — написание текста обзора; О.А. Синещев — концепция работы, написание и редактирование текста обзора.

Финансирование. Работа выполнена за счет частных средств авторов.

Благодарности. Авторы выражают признательность всем коллегам, работы которых процитированы в этом обзоре.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящий обзор не содержит описания каких-либо ис-

следований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Drachev, L. A., Kaulen, A. D., Ostroumov, S. A., and Skulachev, V. P. (1974) Electrogenesis by bacteriorhodopsin incorporated in a planar phospholipid membrane, *FEBS Lett.*, **39**, 43-45, doi: 10.1016/0014-5793(74)80012-8.
2. Drachev, L. A., Kaulen, A. D., and Skulachev, V. P. (1978) Time resolution of the intermediate steps in the bacteriorhodopsin-linked electrogenesis, *FEBS Lett.*, **87**, 161-167, doi: 10.1016/0014-5793(78)80157-4.
3. Драчев Л. А., Каулен А. Д., Скулачев В. П., Хитрина Л. В., Чекулаева Л. Н. (1981) Фазы фотоэлектрического ответа бактериородопсина, *Биохимия*, **46**, 998-1004.
4. Oesterhelt, D., and Stoerkenius, W. (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*, *Nature*, **233**, 149-152, doi: 10.1038/newbio233149a0.
5. Балашов С. П., Литвин Ф. Ф. (1985) *Фотохимические превращения бактериородопсина*, Издательство МГУ, Москва.
6. Kandori, H. (2000) Role of internal water molecules in bacteriorhodopsin, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1460**, 177-191, doi: 10.1016/S0005-2728(00)00138-9.
7. Lanyi, J. K. (2004) Bacteriorhodopsin, *Annu. Rev. Physiol.*, **66**, 665-688, doi: 10.1146/annurev.physiol.66.032102.150049.
8. Wickstrand, C., Nogly, P., Nango, E., Iwata, S., Standfuss, J., and Neutze, R. (2019) Bacteriorhodopsin: Structural insights revealed using X-ray lasers and synchrotron radiation, *Annu. Rev. Biochem.*, **88**, 59-83, doi: 10.1146/annurev-biochem-013118-111327.
9. Синешечков О. А., Литвин Ф. Ф. (1974) Фототаксис микроорганизмов, его механизм и связь с фотосинтезом, *Усп. соврем. биологии*, **78**, 58-75.
10. Nultsch, W., and Häder, D.-P. (1988) Photomovement in motile microorganisms – II, *Photochem. Photobiol.*, **47**, 837-869, doi: 10.1111/j.1751-1097.1988.tb01668.x.
11. Spudich, E. N., and Spudich, J. L. (1982) Control of transmembrane ion fluxes to select halorhodopsin-deficient and other energy-transduction mutants of *Halobacterium halobium*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4308-4312, doi: 10.1073/pnas.79.14.4308.
12. Bogomolni, R., and Spudich, J. L. (1982) Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6250-6254, doi: 10.1073/pnas.79.20.6250.
13. Spudich, J. L., and Bogomolni, R. A. (1984) Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin, *Nature*, **312**, 509-513, doi: 10.1038/312509a0.
14. Takahashi, T., Tomioka, H., Kamo, N., and Kobatake, Y. (1985) A photosystem other than PS370 also mediates the negative phototaxis of *Halobacterium halobium*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **28**, 161-164, doi: 10.1111/j.1574-6968.1985.tb00784.x.
15. Feinleib, M. E. H., and Curry, G. M. (1971) The relationship between stimulus intensity and oriented phototactic response (topotaxis) in *Chlamydomonas*, *Physiol. Plantarum*, **25**, 346-352, doi: 10.1111/j.1399-3054.1971.tb01453.x.
16. Kondratieva, E. N., and Gogotov, I. N. (1969) Production of hydrogen by green photosynthetic bacteria (*Chloropseudomonas*), *Nature*, **221**, 83-84, doi: 10.1038/221083a0.
17. Булычев А. А., Андрианов В. К., Курелла Г. А., Литвин Ф. Ф. (1971) Трансмембранный потенциал хлоропласта и его фотоиндуцированные изменения, *Докл. Акад. Наук СССР*, **197**, 473-477.
18. Синешечков О. А., Андрианов В. К., Курелла Г. А., Литвин Ф. Ф. (1976) Биоэлектрические явления у одноклеточной зеленой водоросли и их связь с фототаксисом и фотосинтезом, *Физиол. растений*, **23**, 229-237.
19. Синешечков О. А., Синешечков В. А., Литвин Ф. Ф. (1978) Фотоиндуцированные биоэлектрические реакции в фототаксисе одноклеточной жгутиковой водоросли, *Докл. Акад. Наук СССР*, **239**, 471-474.
20. Litvin, F. F., Sineshchekov, O. A., and Sineshchekov, V. A. (1978) Photoreceptor electric potential in the phototaxis of the alga *Haematococcus pluvialis*, *Nature*, **271**, 476-478, doi: 10.1038/271476a0.
21. 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, doi: 10.1016/1011-1344(92)85051-U.
22. Kreimer, G. (1994) Cell biology of phototaxis in flagellate algae, *Int. Rev. Cytol.*, **148**, 229-310, doi: 10.1016/S0074-7696(08)62409-2.
23. 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.
24. Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., Jung, K.-H., Zauner, S., Maier, U.-G., and Spudich, J. L. (2005) Rhodopsin-mediated photoreception in cryptophyte

- flagellates, *Biophys. J.*, **89**, 4310-4319, doi: 10.1529/biophysj.105.070920.
25. Sineshchekov, O. A., and Spudich, J. L. (2005) *Sensory rhodopsin signaling in green flagellate algae*. in *Handbook of Photosensory Receptors*, Wiley-VCH, Weinheim, pp. 25-42, doi: 10.1002/352760510X.ch2.
 26. Govorunova, E. G., Spudich, E. N., Lane, C. E., Sineshchekov, O. A., and Spudich, J. L. (2011) New channelrhodopsin with a red-shifted spectrum and rapid kinetics from *Mesostigma viride*, *mBio*, **2**, e00115-00111, doi: 10.1128/mBio.00115-11.
 27. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Li, H., Janz, R., and Spudich, J. L. (2013) Characterization of a highly efficient blue-shifted channelrhodopsin from the marine alga *Platymonas subcordiformis*, *J. Biol. Chem.*, **288**, 29911-29922, doi: 10.1074/jbc.M113.505495.
 28. 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, doi: 10.1016/S0006-3495(04)74291-5.
 29. Foster, K.-W., and Smyth, R. D. (1980) Light antennas in phototactic algae, *Microbiol. Rev.*, **44**, 572-630, doi: 10.1128/mr.44.4.572-630.1980.
 30. Foster, K.-W., Saranak, J., Patel, N., Zarrilli, G., Okabe, M., Kline, T., and Nakanishi, K. (1984) A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*, *Nature*, **311**, 756-759, doi: 10.1038/311756a0.
 31. Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., Der, A., Keszthelyi, L., and Nultsch, W. (1994) Photoinduced electric currents in carotenoid-deficient *Chlamydomonas* mutants reconstituted with retinal and its analogs, *Biophys. J.*, **66**, 2073-2084, doi: 10.1016/S0006-3495(94)81002-1.
 32. Sineshchekov, O. A., and Govorunova, E. G. (1999) Rhodopsin-mediated photosensing in green flagellated algae, *Trends Plant Sci.*, **4**, 58-63, doi: 10.1016/s1360-1385(98)01370-3.
 33. 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, doi: 10.1126/science.1072068.
 34. 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, doi: 10.1073/pnas.1936192100.
 35. Suzuki, T., Yamasaki, K., Fujita, S., Oda, K., Iseki, M., Yoshida, K., Watanabe, M., Daiyasu, H., Toh, H., Asamizu, E., Tabata, S., Miura, K., Fukuzawa, H., Nakamura, S., and Takahashi, T. (2003) Archaeal-type rhodopsins in *Chlamydomonas*: model structure and intracellular localization, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **301**, 711-717, doi: 10.1016/s0006-291x(02)03079-6.
 36. Nagel, G., Mockel, B., Buldt, G., and Bamberg, E. (1995) Functional expression of bacteriorhodopsin in oocytes allows direct measurement of voltage dependence of light induced H⁺ pumping, *FEBS Lett.*, **377**, 263-266, doi: 0014-5793(95)01356-3.
 37. 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.
 38. Nagel, G., Brauner, M., Liewald, J. F., Adeishvili, N., Bamberg, E., and Gottschalk, A. (2005) Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses, *Curr. Biol.*, **15**, 2279-2284, doi: 10.1016/j.cub.2005.11.032.
 39. Li, X., Gutierrez, D. V., Hanson, M. G., Han, J., Mark, M. D., Chiel, H., Hegemann, P., Landmesser, L. T., and Herlitze, S. (2005) Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 17816-17821, doi: 10.1073/pnas.0509030102.
 40. Deisseroth, K. (2011) Optogenetics, *Nat. Methods*, **8**, 26-29, doi: 10.1038/nmeth.f.324.
 41. Yawo, H., Asano, T., Sakai, S., and Ishizuka, T. (2013) Optogenetic manipulation of neural and non-neural functions, *Dev. Growth Differ.*, **55**, 474-490, doi: 10.1111/dgd.12053.
 42. Deisseroth, K. (2015) Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience, *Nat. Neurosci.*, **18**, 1213-1225, doi: 10.1038/nn.4091.
 43. Emiliani, V., Entcheva, E., Hedrich, R., Hegemann, P., Konrad, K. R., Lüscher, C., Mahn, M., Pan, Z.-H., Sims, R. R., Vierock, J., and Yizhar, O. (2022) Optogenetics for light control of biological systems, *Nat. Rev. Methods Primers*, **2**, 55, doi: 10.1038/s43586-022-00136-4.
 44. Chow, B. Y., and Boyden, E. S. (2013) Optogenetics and translational medicine, *Sci. Transl. Med.*, **5**, 177ps175, doi: 10.1126/scitranslmed.3003101.
 45. Sasse, P., Funken, M., Beiert, T., and Bruegmann, T. (2019) Optogenetic termination of cardiac arrhythmia: Mechanistic enlightenment and therapeutic application? *Front. Physiol.*, **10**, 675, doi: 10.3389/fphys.2019.00675.
 46. Sahel, J. A., Boulanger-Scemama, E., Pagot, C., Arleo, A., Galluppi, F., Martel, J. N., Esposti, S. D., Delaux, A., de Saint Aubert, J. B., de Montleau, C., Gutman, E., Audo, I., Duebel, J., Picaud, S., Dalkara, D., Blouin, L., Tiel, M., and Roska, B. (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.
 47. Chow, B. Y., Han, X., Dobry, A. S., Qian, X., Chuong, A. S., Li, M., Henninger, M. A., Belfort, G. M.,

- Lin, Y., Monahan, P. E., and Boyden, E. S. (2010) High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps, *Nature*, **463**, 98-102, doi: 10.1038/nature08652.
48. 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.
49. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Li, H., Wang, Y., Brown, L. S., and Spudich, J. L. (2020) RubyACRs, non-algal anion channelrhodopsins with highly red-shifted absorption, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 22833-22840, doi: 10.1073/pnas.2005981117.
50. Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., Li, H., and Spudich, J. L. (2017) Bacteriorhodopsin-like channelrhodopsins: Alternative mechanism for control of cation conductance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E9512-E9519, doi: 10.1073/pnas.1710702114.
51. Govorunova, E. G., Gou, Y., Sineshchekov, O. A., Li, H., Lu, X., Wang, Y., Brown, L. S., St-Pierre, F., Xue, M., and Spudich, J. L. (2022) Kalium channelrhodopsins are natural light-gated potassium channels that mediate optogenetic inhibition, *Nat. Neurosci.*, **25**, 967-974, doi: 10.1038/s41593-022-01094-6.
52. Der, A., and Keszthelyi, L. (2001) Charge motion during the photocycle of bacteriorhodopsin, *Biochemistry (Moscow)*, **66**, 1234-1248, doi: 10.1023/A:1013179101782.
53. Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., Wang, J., Li, H., and Spudich, J. L. (2013) Intramolecular proton transfer in channelrhodopsins, *Biophys. J.*, **104**, 807-817, doi: 10.1016/j.bpj.2013.01.002.
54. Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., Li, H., and Spudich, J. L. (2015) Gating mechanisms of a natural anion channelrhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 14236-14241, doi: 10.1073/pnas.1513602112.
55. Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., Li, H., Wang, Y., and Spudich, J. L. (2023) Sequential absorption of two photons creates a bistable form of RubyACR responsible for its strong desensitization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **120**, e2301521120, doi: 10.1073/pnas.2301521120.
56. Schneider, F., Grimm, C., and Hegemann, P. (2015) Biophysics of channelrhodopsin, *Annu. Rev. Biophys.*, **44**, 167-186, doi: 10.1146/annurev-biophys-060414-034014.
57. Deisseroth, K., and Hegemann, P. (2017) The form and function of channelrhodopsin, *Science*, **357**, eaan5544, doi: 10.1126/science.aan5544.
58. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Li, H., and Spudich, J. L. (2017) Microbial rhodopsins: Diversity, mechanisms, and optogenetic applications, *Annu. Rev. Biochem.*, **86**, 845-872, doi: 10.1146/annurev-biochem-101910-144233.
59. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., and Spudich, J. L. (2021) Emerging diversity of channelrhodopsins and their structure-function relationships, *Front. Cell Neurosci.*, **15**, 800313, doi: 10.3389/fncel.2021.800313.
60. Boyden, E. S. (2011) A history of optogenetics: the development of tools for controlling brain circuits with light, *Front. Biol. Rep.*, **3**, 11, doi: 10.3410/B3-11.
61. Fenno, L., Yizhar, O., and Deisseroth, K. (2011) The development and application of optogenetics, *Annu. Rev. Neurosci.*, **34**, 389-412, doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113817.
62. Hegemann, P., and Nagel, G. (2013) From channelrhodopsins to optogenetics, *EMBO Mol. Med.*, **5**, 1-4, doi: 10.1002/emmm.201202387.
63. Boyden, E. S. (2015) Optogenetics and the future of neuroscience, *Nat. Neurosci.*, **18**, 1200-1201, doi: 10.1038/nn.4094.
64. Richards, R., and Dempsey, R. E. (2015) *From phototaxis to biomedical applications: Investigating the molecular mechanism of channelrhodopsins*, in *Electrophysiology of Unconventional Channels and Pores* (Delcour, A. H., ed) Springer International Publishing Switzerland. pp. 361-381, doi: 10.1007/978-3-319-20149-8_15.
65. Bamberg, E., Gärtner, W., and Trauner, D. (2018) Introduction: Optogenetics and photopharmacology, *Chem. Rev.*, **118**, 10627-10628, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00483.
66. Baylor, D. A., and Hodgkin, A. L. (1973) Detection and resolution of visual stimuli by turtle photoreceptors, *J. Physiol.*, **234**, 163-198, doi: 10.1113/jphysiol.1973.sp010340.
67. Harz, H., and Hegemann, P. (1991) Rhodopsin-regulated calcium currents in *Chlamydomonas*, *Nature*, **351**, 489-491, doi: 10.1038/351489a0.
68. Braun, F. J., and Hegemann, P. (1999) Two light-activated conductances in the eye of the green alga *Volvox carteri*, *Biophys. J.*, **76**, 1668-1678, doi: 10.1016/S0006-3495(99)77326-1.
69. Yoshimura, K. (1996) A novel type of mechanoreception by the flagella of *Chlamydomonas*, *J. Exp. Biol.*, **199**, 295-302, doi: 10.1242/jeb.199.2.295.
70. Sineshchekov, O. A., and Govorunova, E. G. (2001) *Electrical events in photomovements of green flagellated algae*, in *Comprehensive Series in Photosciences* (Hader, D.-P., and Lebert, M., eds) Elsevier, Amsterdam, pp. 245-280, doi: 10.1016/S1568-461X(01)80013-2.
71. Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., and Spudich, J. L. (2021) *Probing channelrhodopsin electrical activity in algal cell populations*, in *Channelrhodopsin* (Dempsey, R., ed) 2020/09/01 Ed., Humana, New York. pp. 85-96, doi: 10.1007/978-1-0716-0830-2_6.
72. Kreimer, G., Overländer, C., Sineshchekov, O. A., Stolz, H., Nultsch, W., and Melkonian, M. (1992) Functional analysis of the eyespot in *Chlamydomonas reinhardtii* mutant *ey 627, mt⁻*, *Planta*, **188**, 513-521, doi: 10.1007/BF00197043.
73. Pazour, G., Sineshchekov, O., and Witman, G. B. (1995) Mutational analysis of the phototransduction

- pathway of *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Cell Biol.*, **131**, 427-440, doi: 10.1083/jcb.131.2.427.
74. Matsuda, A., Yoshimura, K., Sineshchekov, O., Hirono, M., and Kamiya, R. (1998) Isolation and characterization of novel *Chlamydomonas* mutants that display phototaxis but not photophobic response, *Cell Motil. Cytoskeleton*, **41**, 353-362, doi: 10.1002/(SICI)1097-0169(1998)41:4<353::AID-CM7>3.0.CO;2-0.
 75. Govorunova, E. G., and Sineshchekov, O. A. (2003) Integration of photo- and chemosensory signaling pathways in *Chlamydomonas*, *Planta*, **216**, 535-540, doi: 10.1007/s00425-002-0901-7.
 76. Govorunova, E. G., Altschuler, I. M., Häder, D. P., and Sineshchekov, O. A. (2000) A novel express bioassay for detecting toxic substances in water by recording rhodopsin-mediated photoelectric responses in *Chlamydomonas* cell suspensions, *Photochem. Photobiol.*, **72**, 320-326, doi: 10.1562/0031-8655(2000)072<0320:anebfd>2.0.co;2.
 77. Govorunova, E. G., and Sineshchekov, O. A. (2017) *Express detection of water pollutants by photoelectric recording from algal cell suspensions*, in *Bioassays: Advanced Methods and Applications* (Häder, D.-P., and Erzinger, G. S., eds) Elsevier, Amsterdam, pp. 289-308, doi: 10.1016/B978-0-12-811861-0.00014-0.
 78. Sineshchekov, O. A. (1991) *Photoreception in unicellular flagellates: bioelectric phenomena in phototaxis*, in *Light in Biology and Medicine* (Douglas, R. D., ed) Plenum Press, New York, pp. 523-532, doi: 10.1007/978-1-4684-5991-3_53.
 79. Синешечков, О. А. (1988) *Фототаксис микроорганизмов и его роль в регуляции фотосинтеза, Фототрофные микроорганизмы* (под ред. Гоготов, И. Н.) Изд-во Академии Наук СССР, Пущино, стр. 11-18.
 80. Yoshimura, K. (1994) Chromophore orientation in the photoreceptor of *Chlamydomonas* as probed by stimulation with polarized light, *Photochem. Photobiol.*, **60**, 594-597, doi: 10.1111/j.1751-1097.1994.tb05154.x.
 81. Mast, S. O. (1911) *Light and the Behavior of Organisms*, Wiley, New York, doi: 10.5962/bhl.title.4601.
 82. Morel-Laurens, N. M. L., and Feinleib, M. E. (1983) Photomovement in an "eyeless" mutant of *Chlamydomonas*, *Photochem. Photobiol.*, **37**, 189-194, doi: 10.1111/j.1751-1097.1983.tb04457.x.
 83. Kreimer, G., and Melkonian, M. (1990) Reflection confocal laser scanning microscopy of eyespot in flagellated green algae, *Eur. J. Cell Biol.*, **53**, 101-111, doi: 10.1016/S1434-4610(99)70032-5.
 84. Berthold, P., Tsunoda, S. P., Ernst, O. P., Mages, W., Gradmann, D., and Hegemann, P. (2008) Channelrhodopsin-1 initiates phototaxis and photophobic responses in *Chlamydomonas* by immediate light-induced depolarization, *Plant Cell*, **20**, 1665-1677, doi: 10.1105/tpc.108.057919.
 85. Mittelmeier, T. M., Thompson, M. D., Ozturk, E., and Dieckmann, C. L. (2013) Independent localization of plasma membrane and chloroplast components during eyespot assembly, *Eukaryot. Cell*, **12**, 1258-1270, doi: 10.1128/EC.00111-13.
 86. Schmidt, M., Gessner, G., Luff, M., Heiland, I., Wagner, V., Kaminski, M., Geimer, S., Eitzinger, N., Reissenweber, T., Voytsekh, O., Fiedler, M., Mittag, M., and Kreimer, G. (2006) Proteomic analysis of the eyespot of *Chlamydomonas reinhardtii* provides novel insights into its components and tactic movements, *Plant Cell*, **18**, 1908-1930, doi: 10.1105/tpc.106.041749.
 87. Melkonian, M., and Robenek, H. (1980) Eyespot membranes of *Chlamydomonas reinhardtii*: a freeze-fracture study, *J. Ultrastruct. Res.*, **72**, 90-102, doi: 10.1016/S0022-5320(80)90138-0.
 88. Awasthi, M., Ranjan, P., Sharma, K., Veetil, S. K., and Kateriya, S. (2016) The trafficking of bacterial type rhodopsins into the *Chlamydomonas* eyespot and flagella is IFT mediated, *Sci. Rep.*, **6**, 34646, doi: 10.1038/srep34646.
 89. Awasthi, M., Ranjan, P., and Kateriya, S. (2018) Cytoplasmic extensions of the channelrhodopsins 1 and 2 interact in *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Appl. Biotechnol. Bioeng.*, **5**, 84-90, doi: 10.15406/jabb.2018.05.00121.
 90. Синешечков О. А., Литвин Ф. Ф. (1988) *Механизмы фототаксиса микроорганизмов. in Молекулярные механизмы биологического действия оптического излучения* (под ред. Рубин А. Б.) Наука, Москва, стр. 412-427.
 91. Witman, G. B. (1993) *Chlamydomonas* phototaxis, *Trends Cell Biol.*, **3**, 403-408, doi: 10.1016/0962-8924(93)90091-e.
 92. Kateriya, S., Nagel, G., Bamberg, E., and Hegemann, P. (2004) "Vision" in single-celled algae, *News Physiol. Sci.*, **19**, 133-137, doi: 10.1152/nips.01517.2004.
 93. Kreimer, G. (2009) The green algal eyespot apparatus: a primordial visual system and more? *Curr. Genet.*, **55**, 19-43, doi: 10.1007/s00294-008-0224-8.
 94. Böhm, M., and Kreimer, G. (2021) *Orient in the world with a single eye: The green algal eyespot and phototaxis*, in *Prog. Bot.* (Cánovas, F. M., Lüttge, U., Risueño, M.-C., and Pretzsch, H., eds). pp. 259-304, doi: 10.1007/124_2020_38.
 95. Sineshchekov, O. A. (1991) *Electrophysiology of photomovements in flagellated algae. in Biophysics of Photoreceptors and Photomovements in Microorganisms* (Lenci, F., Ghetti, F., Colombetti, G., Haeder, D.-P., and Song, P.-S., eds) Plenum Press, New York. pp. 191-202, doi: 10.1007/978-1-4684-5988-3_15.
 96. Ruffer, U., and Nultsch, W. (1990) Flagella photoresponses of *Chlamydomonas* cells held on micropipettes: I. Change in flagellar beat frequency, *Cell Motil. Cytoskeleton*, **15**, 162-167, doi: 10.1002/cm.970150305.
 97. Ruffer, U., and Nultsch, W. (1991) Flagellar photoresponses of *Chlamydomonas* cells held on micropipettes: II. Change in flagellar beat pattern,

- Cell Motil. Cytoskeleton*, **18**, 269-278, doi: 10.1002/cm.970180404.
98. Josef, K., Saranak, J., and Foster, K.-W. (2005) Ciliary behavior of a negatively phototactic *Chlamydomonas reinhardtii*, *Cell Motil. Cytoskeleton*, **61**, 97-111, doi: 10.1002/cm.20069.
 99. Josef, K., Saranak, J., and Foster, K.-W. (2006) Linear systems analysis of the ciliary steering behavior associated with negative-phototaxis in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Cell Motil. Cytoskeleton*, **63**, 758-777, doi: 10.1002/cm.20158.
 100. Holland, E.-M., Harz, H., Uhl, R., and Hegemann, P. (1997) Control of phobic behavioral responses by rhodopsin-induced photocurrents in *Chlamydomonas*, *Biophys. J.*, **73**, 1395-1401, doi: 10.1016/S0006-3495(97)78171-2.
 101. Schmidt, J. A., and Eckert, R. (1976) Calcium couples flagella reversal to photostimulation in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Nature*, **262**, 713-715, doi: 10.1038/262713a0.
 102. Nultsch, W., and Häder, D.-P. (1979) Photomovement of motile microorganisms, *Photochem. Photobiol.*, **29**, 423-437, doi: 10.1111/j.1751-1097.1979.tb07072.x.
 103. Harz, H., Nonnengässer, C., and Hegemann, P. (1992) The photoreceptor current of the green alga *Chlamydomonas*, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **338**, 39-52, doi: 10.1098/rstb.1992.0127.
 104. Beck, C., and Uhl, R. (1994) On the localization of voltage-sensitive calcium channels in the flagella of *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Cell Biol.*, **125**, 1119-1125, doi: 10.1083/jcb.125.5.1119.
 105. Fujiu, K., Nakayama, Y., Yanagisawa, A., Sokabe, M., and Yoshimura, K. (2009) *Chlamydomonas* CAV2 encodes a voltage-dependent calcium channel required for the flagellar waveform conversion, *Curr. Biol.*, **19**, 133-139, doi: 10.1016/j.cub.2008.11.068.
 106. Sineshchekov, O. A., Litvin, F. F., and Keszthelyi, L. (1990) Two components of photoreceptor potential of the flagellated green alga *Haematococcus pluvialis*, *Biophys. J.*, **57**, 33-39, doi: 10.1016/S0006-3495(90)82504-2.
 107. Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., and Spudich, J. L. (2009) Photosensory functions of channelrhodopsins in native algal cells, *Photochem. Photobiol.*, **85**, 556-563, doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00524.x.
 108. Hegemann, P., and Marwan, W. (1988) Single photons are sufficient to trigger movement responses in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Photochem. Photobiol.*, **48**, 99-106, doi: 10.1111/j.1751-1097.1988.tb02793.x.
 109. Verret, F., Wheeler, G., Taylor, A. R., Farnham, G., and Brownlee, C. (2010) Calcium channels in photosynthetic eukaryotes: implications for evolution of calcium-based signalling, *New Phytol.*, **187**, 23-43, doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03271.x.
 110. Wagner, V., Ullmann, K., Mollwo, A., Kaminski, M., Mittag, M., and Kreimer, G. (2008) The phosphoproteome of a *Chlamydomonas reinhardtii* eyespot fraction includes key proteins of the light signaling pathway, *Plant Physiol.*, **146**, 772-788, doi: 10.1104/pp.107.109645.
 111. Linden, L., and G., K. (1995) Calcium modulates rapid protein phosphorylation/dephosphorylation in isolated eyespot apparatuses of the green alga *Spermatozopsis similis*, *Planta*, **197**, 343-351, doi: 10.1007/BF00202656.
 112. Schlicher, U., Linden, L., Calenberg, M., and Kreimer, G. (1995) G proteins and Ca²⁺ modulated protein kinases of a plasma membrane enriched fraction and isolated eyespot apparatuses of *Spermatozopsis similis* (Chlorophyceae), *Eur. J. Phycol.*, **30**, 319-330, doi: 10.1080/09670269500651111.
 113. Calenberg, M., Brohnschonn, U., Zedlacher, M., and Kreimer, G. (1998) Light- and Ca²⁺-modulated heteromeric GTPases in the eyespot apparatus of a flagellate green alga, *Plant Cell*, **10**, 91-103, doi: 10.1105/tpc.10.1.91.
 114. Trippens, J., Greiner, A., Schellwat, J., Neukam, M., Rottmann, T., Lu, Y., Kateriya, S., Hegemann, P., and Kreimer, G. (2012) Phototropin influence on eyespot development and regulation of phototactic behavior in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Cell*, **24**, 4687-702, doi: 10.1105/tpc.112.103523.
 115. Holland, E.-M., Braun, F.-J., Nonnengässer, C., Harz, H., and Hegemann, P. (1996) The nature of rhodopsin-triggered photocurrents in *Chlamydomonas*. I. Kinetics and influence of divalent ions, *Biophys. J.*, **70**, 924-931, doi: 10.1016/S0006-3495(96)79635-2.
 116. Nonnengässer, C., Holland, E.-M., Harz, H., and Hegemann, P. (1996) The nature of rhodopsin-activated photocurrents in *Chlamydomonas*. II. Influence of monovalent ions, *Biophys. J.*, **70**, 932-938, doi: 10.1016/S0006-3495(96)79636-4.
 117. Ritter, E., Stehfest, K., Berndt, A., Hegemann, P., and Bartl, F. J. (2008) Monitoring light-induced structural changes of Channelrhodopsin-2 by UV-visible and Fourier transform infrared spectroscopy, *J. Biol. Chem.*, **283**, 35033-35041, doi: 10.1074/jbc.M806353200.
 118. Bamann, C., Kirsch, T., Nagel, G., and Bamberg, E. (2008) Spectral characteristics of the photocycle of channelrhodopsin-2 and its implication for channel function, *J. Mol. Biol.*, **375**, 686-694, doi: 10.1016/j.jmb.2007.10.072.
 119. Baidukova, O., Oppermann, J., Kelterborn, S., Fernandez Lahore, R. G., Schumacher, D., Evers, H., Kamrani, Y. Y., and Hegemann, P. (2022) Gating and ion selectivity of channelrhodopsins are critical for photo-activated orientation of *Chlamydomonas* as shown by *in vivo* point mutation, *Nat Commun*, **13**, 7253, doi: 10.1038/s41467-022-35018-6.
 120. Dent, R. M., Haglund, C. M., Chin, B. L., Kobayashi, M. C., and Niyogi, K. K. (2005) Functional genomics of eukaryotic photosynthesis using insertional mutagenesis of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.*, **137**, 545-556, doi: 10.1104/pp.104.055244.

121. Sizova, I., Greiner, A., Awasthi, M., Kateriya, S., and Hegemann, P. (2013) Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases, *Plant J.*, **73**, 873–882, doi: 10.1111/tpj.12066.
122. Greiner, A., Kelterborn, S., Evers, H., Kreimer, G., Sizova, I., and Hegemann, P. (2017) Targeting of photoreceptor genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via zinc-finger nucleases and CRISPR/Cas9, *Plant Cell*, **29**, 2498–2518, doi: 10.1105/tpc.17.00659.
123. Sineshchekov, O. A., Spudich, E. N., Trivedi, V. D., and Spudich, J. L. (2006) Role of the cytoplasmic domain in *Anabaena* sensory rhodopsin photocycling: vectoriality of Schiff base deprotonation, *Biophys. J.*, **91**, 4519–4527, doi: 10.1529/biophysj.106.093641.
124. Tashiro, R., Sushmita, K., Hososhima, S., Sharma, S., Kateriya, S., Kandori, H., and Tsunoda, S. P. (2021) Specific residues in the cytoplasmic domain modulate photocurrent kinetics of channelrhodopsin from the alga *Klebsormidium nitens*, *Commun. Biol.*, **4**, 235, doi: 10.1038/s42003-021-01755-5.
125. Böhm, M., Boness, D., Fantisch, E., Erhard, H., Frauenholz, J., Kowalzyk, Z., Marcinkowski, N., Kateriya, S., Hegemann, P., and Kreimer, G. (2019) Channelrhodopsin-1 phosphorylation changes with the phototactic behavior and responds to physiological stimuli in *Chlamydomonas*, *Plant Cell*, **31**, 886–910, doi: 10.1105/tpc.18.00936.
126. Awasthi, M., Sushmita, K., Kaushik, M. S., Ranjan, P., and Kateriya, S. (2020) Novel modular rhodopsins from green algae hold great potential for cellular optogenetic modulation across the biological model systems, *Life*, **10**, 259, doi: 10.3390/life10110259.
127. 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, doi: 10.1016/j.cub.2020.09.056.
128. Sharma, K., Sizova, I., Sanyal, S. K., Pandey, G. K., Hegemann, P., and Kateriya, S. (2023) Deciphering the role of cytoplasmic domain of Channelrhodopsin in modulating the interactome and SUMOylation of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Int. J. Biol. Macromol.*, **243**, 125135, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125135.
129. Matasci, N., Hung, L. H., Yan, Z., Carpenter, E. J., Wickett, N. J., Mirarab, S., Nguyen, N., Warnow, T., Ayyampalayam, S., Barker, M., Burleigh, J. G., Gitzendanner, M. A., Wafula, E., Der, J. P., dePamphilis, C. W., Roure, B., Philippe, H., Ruhfel, B. R., Miles, N. W., Graham, S. W., et al. (2014) Data access for the 1,000 Plants (1KP) project, *Giga-science*, **3**, 17, doi: 10.1186/2047-217X-3-17.
130. Wong, G. K., Soltis, D. E., Leebens-Mack, J., Wickett, N. J., Barker, M. S., Van de Peer, Y., Graham, S. W., and Melkonian, M. (2020) Sequencing and analyzing the transcriptomes of a thousand species across the tree of life for green plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **71**, 741–765, doi: 10.1146/annurev-arplant-042916-041040.
131. 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. S., and Spudich, J. L. (2021) Cation and anion channelrhodopsins: Sequence motifs and taxonomic distribution, *MBio*, **12**, e0165621, doi: 10.1128/mBio.01656-21.
132. Glock, C., Nagpal, J., and Gottschalk, A. (2015) Microbial rhodopsin optogenetic tools: Application for analyses of synaptic transmission and of neuronal network activity in behavior, *Methods Mol. Biol.*, **1327**, 87–103, doi: 10.1007/978-1-4939-2842-2_8.
133. Tsunoda, S. P., and Hegemann, P. (2009) Glu 87 of channelrhodopsin-1 causes pH-dependent color tuning and fast photocurrent inactivation, *Photochem. Photobiol.*, **85**, 564–569, doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00519.x.
134. Говорунова Е. Г., Синешечков О. А., Спудич Д. Л. (2017) Три семейства канальных родопсинов и их использование в оптогенетике, *Журн. Высш. Нервной Деятельности*, **67**, 1–9.
135. Watanabe, M., and Furuya, M. (1982) Phototactic behavior of individual cells of *Cryptomonas* sp. in response to continuous and intermittent light stimuli, *Photochem. Photobiol.*, **35**, 559–563, doi: 10.1111/j.1751-1097.1982.tb02609.x.
136. Rhiel, E., Häder, D.-P., and Wehrmeyer, W. (1988) Photo-orientation in a freshwater *Cryptomonas* species, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **2**, 123–132, doi: 10.1016/1011-1344(88)85041-3.
137. Erata, M., Kubota, M., Takahashi, T., Inouye, I., and Watanabe, M. (1995) Ultrastructure and phototactic action spectra of two genera of cryptophyte flagellate algae, *Cryptomonas* and *Chroomonas*, *Protoplasma*, **188**, 258–266, doi: 10.1007/BF01280378.
138. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., and Spudich, J. L. (2016) Structurally distinct cation channelrhodopsins from cryptophyte algae, *Biophys. J.*, **110**, 2302–2304, doi: S0006-3495(16)30274-0.
139. Gradinaru, V., Zhang, F., Ramakrishnan, C., Mattis, J., Prakash, R., Diester, I., Goshen, I., Thompson, K. R., and Deisseroth, K. (2010) Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics, *Cell*, **141**, 154–165, doi: 10.1016/j.cell.2010.02.037.
140. Yamauchi, Y., Konno, M., Ito, S., Tsunoda, S. P., Inoue, K., and Kandori, H. (2017) Molecular properties of a DTD channelrhodopsin from *Guillardia theta*, *Biophys. Physicobiol.*, **14**, 57–66, doi: 10.2142/biophysico.14.0_57.
141. Hososhima, S., Ueno, S., Okado, S., Inoue, K. I., Konno, M., Yamauchi, Y., Inoue, K., Terasaki, H., Kandori, H., and Tsunoda, S. P. (2023) A light-gated cation channel with high reactivity to weak light, *Sci Rep.*, **13**, 7625, doi: 10.1038/s41598-023-34687-7.

142. Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., Li, H., Wang, Y., Melkonian, M., Wong, G. K.-S., Brown, L. S., and Spudich, J. L. (2020) Conductance mechanisms of rapidly desensitizing cation channelrhodopsins from cryptophyte algae, *mBio*, **11**, e00657-20, doi: 10.1128/mBio.00657-20.
143. Kishi, K. E., Kim, Y. S., Fukuda, M., Inoue, M., Kusakizako, T., Wang, P. Y., Ramakrishnan, C., Byrne, E. F. X., Thadhani, E., Paggi, J. M., Matsui, T. E., Yamashita, K., Nagata, T., Konno, M., Quirin, S., Lo, M., Benster, T., Uemura, T., Liu, K., Shibata, M., et al. (2022) Structural basis for channel conduction in the pump-like channelrhodopsin ChRmine, *Cell*, **185**, 672-689.e623, doi: 10.1016/j.cell.2022.01.007.
144. Tucker, K., Sridharan, S., Adesnik, H., and Brohawn, S. G. (2022) Cryo-EM structures of the channelrhodopsin ChRmine in lipid nanodiscs, *Nat. Commun.*, **13**, 4842, doi: 10.1038/s41467-022-32441-7.
145. Kato, H. E., Zhang, F., Yizhar, O., Ramakrishnan, C., Nishizawa, T., Hirata, K., Ito, J., Aita, Y., Tsukazaki, T., Hayashi, S., Hegemann, P., Maturana, A. D., Ishitani, R., Deisseroth, K., and Nureki, O. (2012) Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel, *Nature*, **482**, 369-374, doi: 10.1038/nature10870.
146. Volkov, O., Kovalev, K., Polovinkin, V., Borshchevskiy, V., Bamann, C., Astashkin, R., Marin, E., Popov, A., Balandin, T., Willbold, D., Buldt, G., Bamberg, E., and Gordeliy, V. (2017) Structural insights into ion conduction by channelrhodopsin 2, *Science*, **358**, eaan8862, doi: 10.1126/science.aan8862.
147. Oda, K., Vierock, J., Oishi, S., Rodriguez-Rozada, S., Taniguchi, R., Yamashita, K., Wiegert, J. S., Nishizawa, T., Hegemann, P., and Nureki, O. (2018) Crystal structure of the red light-activated channelrhodopsin Chrimson, *Nat. Commun.*, **9**, 3949, doi: 10.1038/s41467-018-06421-9.
148. Marshel, J. H., Kim, Y. S., Machado, T. A., Quirin, S., Benson, B., Kadmon, J., Raja, C., Chibukhchyan, A., Ramakrishnan, C., Inoue, M., Shane, J. C., McKnight, D. J., Yoshizawa, S., Kato, H. E., Ganguli, S., and Deisseroth, K. (2019) Cortical layer-specific critical dynamics triggering perception, *Science*, **365**, eaaw5202, doi: 10.1126/science.aaw5202.
149. Chen, R., Gore, F., Nguyen, Q. A., Ramakrishnan, C., Patel, S., Kim, S. H., Raffiee, M., Kim, Y. S., Hsueh, B., Krook-Magnusson, E., Soltesz, I., and Deisseroth, K. (2020) Deep brain optogenetics without intracranial surgery, *Nat. Biotechnol.*, **39**, 161-164, doi: 10.1038/s41587-020-0679-9.
150. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Rodarte, E. M., Janz, R., Morelle, O., Melkonian, M., Wong, G. K.-S., and Spudich, J. L. (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.
151. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Hemmati, R., Janz, R., Morelle, O., Melkonian, M., Wong, G. K. S., and Spudich, J. L. (2018) Extending the time domain of neuronal silencing with cryptophyte anion channelrhodopsins, *eNeuro*, **5**, ENEURO.0174-0118.2018, doi: 10.1523/ENEURO.0174-18.2018.
152. Долгих Д. А., Малышев А. Ю., Саложин С. В., Некрасова О. В., Петровская Л. Е., Рошин М. В., Бородинова А. А., Фельдман Т. Б., Балабан П. М., Кирпичников М. П., Островский М. А. (2015) Анионный канальный родопсин, экспрессированный в культуре нейронов и *in vivo* в мозге мыши: светоиндуцированное подавление генерации потенциалов действия, *Докл. Акад. Наук*, **465**, 737-740, doi: 10.7868/S086956521536030X.
153. Mohammad, F., Stewart, J. C., Ott, S., Chlebikova, K., Chua, J. Y., Koh, T. W., Ho, J., and Claridge-Chang, A. (2017) Optogenetic inhibition of behavior with anion channelrhodopsins, *Nat. Methods*, **14**, 271-274, doi: 10.1038/nmeth.4148.
154. Mohamed, G. A., Cheng, R. K., Ho, J., Krishnan, S., Mohammad, F., Claridge-Chang, A., and Jesuthasan, S. (2017) Optical inhibition of larval zebrafish behaviour with anion channelrhodopsins, *BMC Biol.*, **15**, 103, doi: 10.1186/s12915-017-0430-2.
155. Bergs, A., Schultheis, C., Fischer, E., Tsunoda, S. P., Erbguth, K., Husson, S. J., Govorunova, E. G., Spudich, J. L., Nagel, G., Gottschalk, A., and Liewald, J. F. (2018) Rhodopsin optogenetic toolbox v2.0 for light-sensitive excitation and inhibition in *Caenorhabditis elegans*, *PLoS One*, **13**, e0191802, doi: 10.1371/journal.pone.0191802.
156. Wilson, D. E., Scholl, B., and Fitzpatrick, D. (2018) Differential tuning of excitation and inhibition shapes direction selectivity in ferret visual cortex, *Nature*, **560**, 97-101, doi: 10.1038/s41586-018-0354-1.
157. Forli, A., Vecchia, D., Binini, N., Succol, F., Bovetti, S., Moretti, C., Nespoli, F., Mahn, M., Baker, C. A., Bolton, M. M., Yizhar, O., and Fellin, T. (2018) Two-photon bidirectional control and imaging of neuronal excitability with high spatial resolution *in vivo*, *Cell Rep.*, **22**, 3087-3098, doi: 10.1016/j.celrep.2018.02.063.
158. Andrei, A. R., Debes, S., Chelaru, M., Liu, X., Rodarte, E., Spudich, J. L., Janz, R., and Dragoi, V. (2021) Heterogeneous side-effects of cortical inactivation in behaving animals, *Elife*, **10**, e66400, doi: 10.7554/eLife.66400.
159. Huang, S., Ding, M., Roelfsema, M. R. G., Dreyer, I., Scherzer, S., Al-Rasheid, K. A. S., Gao, S., Nagel, G., Hedrich, R., and Konrad, K. R. (2021) Optogenetic control of the guard cell membrane potential and stomatal movement by the light-gated anion channel *GtACR1*, *Sci Adv*, **7**, eabg4619, doi: 10.1126/sciadv.abg4619.
160. Zhou, Y., Ding, M., Gao, S., Yu-Strzelczyk, J., Krischke, M., Duan, X., Leide, J., Riederer, M.,

- Mueller, M. J., Hedrich, R., Konrad, K. R., and Nagel, G. (2021) Optogenetic control of plant growth by a microbial rhodopsin, *Nat. Plants*, **7**, 144-151, doi: 10.1038/s41477-021-00853-w.
161. Oppermann, J., Fischer, P., Silapetere, A., Liepe, B., Rodriguez-Rozada, S., Flores-Urbe, J., Peter, E., Keidel, A., Vierock, J., Kaufmann, J., Broser, M., Luck, M., Bartl, F., Hildebrandt, P., Simon Wiegert, J., Beja, O., Hegemann, P., and Wietek, J. (2019) MerMAIDs: a family of metagenomically discovered marine anion-conducting and intensely desensitizing channelrhodopsins, *Nat. Commun.*, **10**, 3315, doi: 10.1038/s41467-019-11322-6.
162. Malyshev, A. Y., Roshchin, M. V., Smirnova, G. R., Dolgikh, D. A., Balaban, P. M., and Ostrovsky, M. A. (2017) Chloride conducting light activated channel GtACR2 can produce both cessation of firing and generation of action potentials in cortical neurons in response to light, *Neurosci. Lett.*, **640**, 76-80, doi: 10.1016/j.neulet.2017.01.026.
163. Messier, J. E., Chen, H., Cai, Z. L., and Xue, M. (2018) Targeting light-gated chloride channels to neuronal somatodendritic domain reduces their excitatory effect in the axon, *Elife*, **7**, e38506, doi: 10.7554/eLife.38506.
164. Mahn, M., Prigge, M., Ron, S., Levy, R., and Yizhar, O. (2016) Biophysical constraints of optogenetic inhibition at presynaptic terminals, *Nat. Neurosci.*, **19**, 554-556, doi: 10.1038/nn.4266.
165. Mahn, M., Gibor, L., Patil, P., Cohen-Kashi Malina, K., Oring, S., Printz, Y., Levy, R., Lampl, I., and Yizhar, O. (2018) High-efficiency optogenetic silencing with soma-targeted anion-conducting channelrhodopsins, *Nat. Commun.*, **9**, 4125, doi: 10.1038/s41467-018-06511-8.
166. Mardinly, A. R., Oldenburg, I. A., Pegard, N. C., Sridharan, S., Lyall, E. H., Chesnov, K., Brohawn, S. G., Waller, L., and Adesnik, H. (2018) Precise multimodal optical control of neural ensemble activity, *Nat. Neurosci.*, **21**, 881-893, doi: 10.1038/s41593-018-0139-8.
167. Vierock, J., Peter, E., Grimm, C., Rozenberg, A., Chen, I. W., Tillert, L., Castro Scalise, A. G., Casini, M., Augustin, S., Tanese, D., Forget, B. C., Peyronnet, R., Schneider-Warme, F., Emiliani, V., Bèjà, O., and Hegemann, P. (2022) WiChR, a highly potassium selective channelrhodopsin for low-light one- and two-photon inhibition of excitable cells, *Sci. Adv.*, **8**, eadd7729, doi: 10.1126/sciadv.add7729.
168. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Brown, L. S., Bondar, A. N., and Spudich, J. L. (2022) Structural foundations of potassium selectivity in channelrhodopsins, *mBio*, **13**, e0303922, doi: 10.1128/mbio.03039-22.
169. Fan, L. Z., Kim, D. K., Jennings, J. H., Tian, H., Wang, P. Y., Ramakrishnan, C., Randles, S., Sun, Y., Thadhani, E., Kim, Y. S., Quirin, S., Giocomo, L., Cohen, A. E., and Deisseroth, K. (2023) All-optical physiology resolves a synaptic basis for behavioral timescale plasticity, *Cell*, **186**, 543-559, doi: 10.1016/j.cell.2022.12.035.

CHANNELRHODOPSINS: FROM PHOTOTAXIS TO OPTOGENETICS

Review

E. G. Govorunova and O. A. Sineshchekov*

e-mail: egovoru@yahoo.com; oleg_sinesh@yahoo.com

Channelrhodopsins stand out among other retinal proteins because of their capacity to generate passive ionic currents following photoactivation. Owing to that, channelrhodopsins are widely used in neuroscience and cardiology as instruments for optogenetic manipulation of the activity of excitable cells. Photocurrents generated by channelrhodopsins were first discovered in the cells of green algae in the 1970s. In this review we describe this discovery and discuss the current state of research in this field.

Keywords: rhodopsins, ion channels, photoreception, membrane potential, flagellate algae, neurons